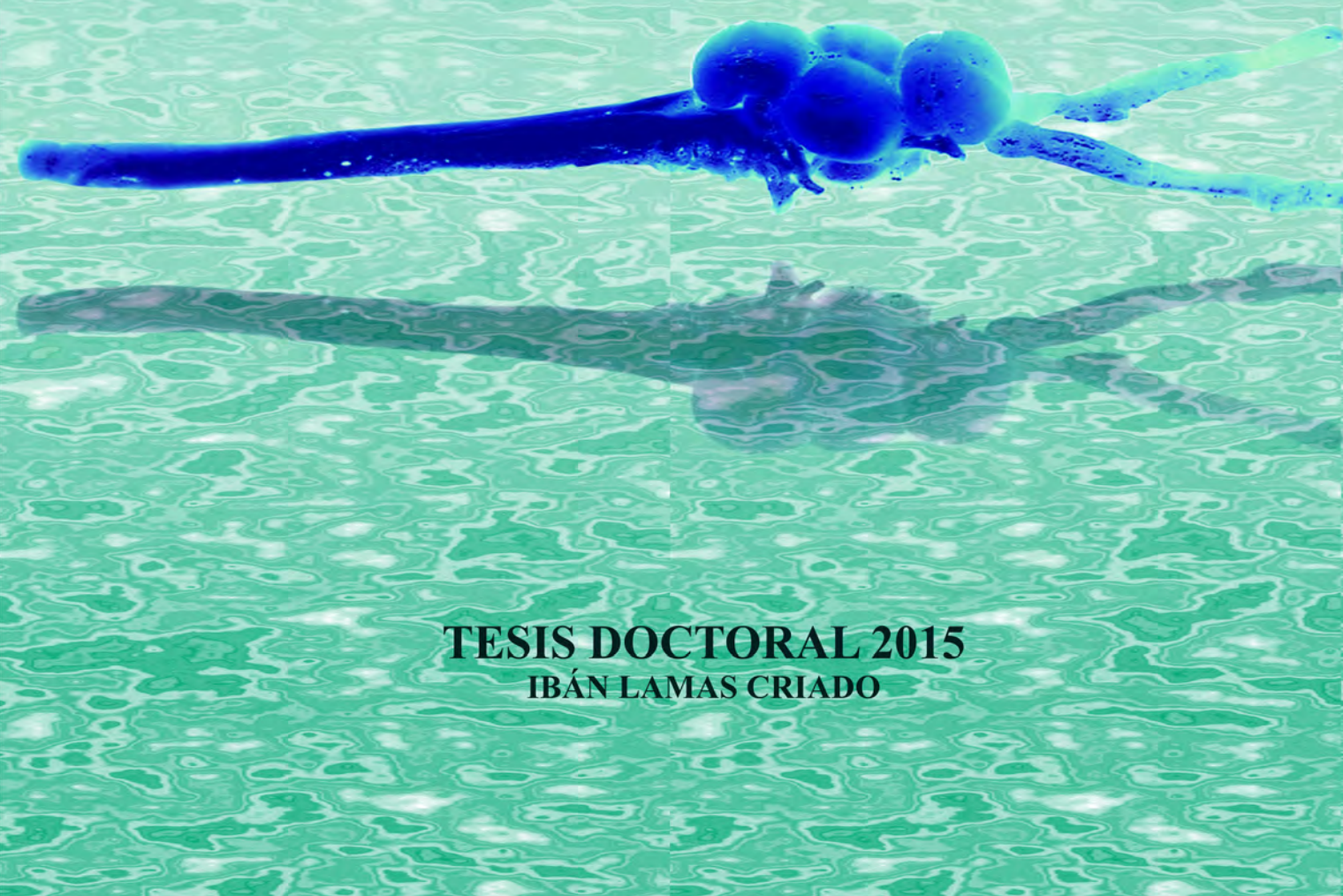




UNIVERSIDAD DE A CORUÑA

Estudio inmunohistoquímico de los sistemas
mediados por la carnosina (β -alanil-L-histidina)
y dipéptidos relacionados en el encéfalo de ejemplares
adultos de múgil (*Chelon labrosus*)



TESIS DOCTORAL 2015
IBÁN LAMAS CRIADO





UNIVERSIDAD DE A CORUÑA
Departamento de Biología Celular y Molecular
Área de Biología Celular

Dña. Sofía Díaz Regueira, profesora titular jubilada de Biología Celular en el Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidad de A Coruña, y D. Antonio Manuel Castro Castro, profesor contratado doctor en el citado Departamento,

INFORMAN:

Que la presente memoria titulada: “Estudio inmunohistoquímico de los sistemas mediados por la carnosina (β -alanil-L-histidina) y dipéptidos relacionados en el encéfalo de ejemplares adultos de mágil (*Chelon labrosus*)”, presentada por D. Ibán Lamas Criado, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidad de A Coruña. Considerando que cumple las condiciones exigidas para aspirar al Grado de Doctor en Biología autorizamos su presentación como trabajo de Tesis Doctoral.

Y para que conste firmamos el presente informe en A Coruña a 28 de Septiembre de dos mil quince

El doctorando

La Directora de la Tesis

El Director de la Tesis

Fdo.- Ibán Lamas Criado

Fdo.- Sofía Díaz Regueira

Fdo.- Antonio M. Castro Castro

Esta Tesis Doctoral forma parte del Proyecto de investigación que a continuación se menciona:

“Estudio hodológico del encéfalo de peces” financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (Cod. BFU 2004-03144).

*A todas las personas que a lo largo estos
años me apoyaron, confiaron y creyeron en mí*

AGRADECIMIENTOS

Aunque las siguientes palabras no puedan expresar la gratitud que siento, quisiera plasmar en estas líneas mi más profundo y sincero agradecimiento a las siguientes personas:

A la Dra. Sofía Díaz Regueira, directora de esta tesis, por haberme brindado la oportunidad de entrar en el mundo de la investigación, confiar en mí, aconsejarme y guiarme acertadamente en la realización de este trabajo.

Al Dr. Antonio Manuel Castro Castro, director de esta tesis, por sus consejos, ayuda y sacrificio incondicional en las etapas finales de la elaboración de este trabajo, convirtiéndose en un referente tanto profesional como personal para mí.

Al Dr. Ramón Anadón Álvarez ya que sin su ayuda y sus conocimientos, parte de este trabajo no hubiese visto la luz dentro de la comunidad científica.

A todos los profesores y ahora compañeros del Área de Biología Celular: Julián, María José y Lula, que de una u otra forma me han prestado su apoyo en las áreas de la investigación y docencia y especialmente a Chus, porque sin su ayuda, su apoyo incondicional y ánimo, hubiese sido más difícil haber llegado hasta aquí.

A todos mis compañeros del laboratorio, los que todavía siguen y los que ya no están: Verónica, Ángeles, Jose, Gema, May, Patricia y de manera muy especial a Mónica, compañera además de amiga, por hacer que todos esos momentos que hemos pasado juntos hayan sido siempre enriquecedores tanto de manera científica como personal.

A Merce, amiga y compañera de fatigas, por estar siempre ahí, por sus ánimos, sus “contemporizaciones”, sus “preparaciones” y un largo etc.

Y finalmente, a Miriam, porque en esta última etapa hemos vivido, a pesar de las circunstancias, momentos de ayuda mutua y buen humor.


*Quisiera expresar también mi agradecimiento a
mi padres por todo su amor y sacrificio,
a mis hermanos, cuñad@s, sobrin@s, ahijad@s, mi segunda madre y todos
mis amig@, por estar a mi lado siempre que los necesito y por hacer que
todos los momentos que compartimos sean especiales.
Y a Moni por ser la chispa que ilumina y da sentido a mi vida.*

Resumen

La distribución del dipéptido carnosina (β -alanil-L-histidina) y sus dipéptidos relacionados, anserina y homocarnosina, ha sido estudiada por métodos bioquímicos e inmunohistoquímicos en el cerebro de mamíferos y otros tetrápodos. Tales estudios indicaron la presencia de estos dipéptidos principalmente en células gliales y algunas neuronas (neuronas receptoras olfativas, neuronas supuestamente migradoras y neuroblastos). En este estudio, mediante técnicas inmunohistoquímicas utilizando un anticuerpo policlonal contra la carnosina y/o dipéptidos relacionados, se ha demostrado por primera vez su presencia y distribución en el encéfalo de un pez teleósteo, el múgil (*Chelon labrosus*). Los resultados obtenidos muestran que la carnosina y/o dipéptidos relacionados está presente en poblaciones neuronales distribuidas en todas las subdivisiones del encéfalo, así como en células gliales de algunas regiones endimarias y subendimarias. La inmunorreactividad a la carnosina observada en poblaciones neuronales del encéfalo del múgil presenta una gran similitud a la observada por tritones y notables diferencias con los resultados obtenidos en mamíferos, reptiles y anfibios anuros.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	3
EL MÚGIL	3
Biología y clasificación	3
Morfología	3
Ecología	4
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE PECES TELEÓSTEOS	5
Telencéfalo	7
Diencefalo	11
Área preóptica	12
Hipotálamo	13
Tubérculo posterior	16
Tálamo	18
Epitálamo	19
Pretecho	20
Mesencéfalo	22
Techo óptico	22
Tegmento mesencefálico	24
Rombencéfalo	26
Región del istmo	26
Cerebelo	27
Bulbo raquídeo	28
Médula espinal	32
LA CARNOSINA	33
Distribución de la carnosina en el sistema nervioso de vertebrados	35
Funciones de la carnosina	39
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	41
MATERIAL Y MÉTODOS	45
RESULTADOS	53
Western blotting y controles de especificidad	55
Carnosina en fibras y poblaciones neuronales	56
Telencéfalo	57
Diencefalo	61
Mesencéfalo	64
Rombencéfalo	67
Carnosina en células gliales	72
Esquemas y figuras	75
DISCUSIÓN	147
CONCLUSIONES	183
BIBLIOGRAFÍA	187
ANEXO I	229
ANEXO II	245



Introducción

INTRODUCTION



EL MÚGIL

Biología y clasificación

El mágil (*Chelon labrosus* R.) es un teleósteo ampliamente distribuido en toda la costa gallega, perteneciente a la Familia Mugilidae, Orden Mugiliformes, Serie Mugilomorfa, Superorden Acantopterigios, Subdivisión Euteleósteo, División Teleósteo, Subclase Neopterigios, Clase Actinopterigios, Superclase Gnatóstomos, Filo Cordados (Nelson, 2006).

Los primeros peces teleósteos surgieron con anterioridad a los vertebrados terrestres más primitivos a mediados o finales del triásico, hace unos 200-220 millones de años. Otro grupo de peces óseos, los Sarcopterigios, es considerado como antepasado de los vertebrados terrestres. Los peces óseos, incluyendo los teleósteos, son frecuentemente considerados como “primitivos”, sin embargo, esto podría llevar a conclusiones erróneas, ya que todas las especies de teleósteos actuales han tenido más tiempo para diferenciarse y adaptarse. Así, los teleósteos presentan una gran diversidad, tanto morfológica como funcional, estando adaptados a diferentes nichos ecológicos (tanto de agua dulce como de agua salada).

Los teleósteos son actualmente el grupo más diversificado y más numeroso en número de especies de peces óseos, abarcando aproximadamente unas 26.840 especies (Nelson, 2006). Asimismo, constituyen el grupo con mayor número de representantes dentro de los vertebrados, constituyendo el 96% de los peces existentes, clasificados en 40 órdenes, 448 familias y 4.278 géneros.

El Orden Perciformes/Mugiliformes incluye a los peces óseos más evolucionados. A pesar de ser el orden que presenta una mayor riqueza de adaptaciones ambientales de los teleósteos, después de la radiación específica de éstos en el Jurásico, es uno de los órdenes de Actinopterigios objeto de un menor número de estudios.

Morfología

Los miembros de la familia mugilidae presentan cuerpos fuertes, alargados y fusiformes. El dorso es de un color gris azulado o gris plomo. Este color se va aclarando desde la parte dorsal a la ventral, siendo esta última de color blanco, y la parte lateral de color plateado. Tienen unas finas rayas longitudinales que

desaparecen al llegar a la parte ventral.

En concreto la especie *Chelon labrosus* R. (Fig. 1) tiene la cabeza aplanada y una boca transversal característica, con labios gruesos sobre todo el superior que tiene 2 ó 3 filas irregulares de pequeñas verrugas cutáneas. Los ojos son pequeños y están cubiertos por una especie de párpado translúcido.

Presenta grandes escamas cicloideas, dos aletas dorsales de pequeño tamaño y muy separadas, la primera con 4 radios espinosos y la



Fig. 1. Fotografía correspondiente a la visión lateral de la anatomía externa del mágil (*Chelon labrosus* R.)

segunda con un radio duro y 8 ó 9 blandos. La aleta caudal es simétrica y escotada. Presenta también una aleta anal opuesta a la segunda aleta dorsal, con 3 radios espinosos y 9 ó 10 radios blandos, siendo las aletas pectorales cortas. Su línea lateral está poco definida, y tiene un filtro de branquiespinas muy tupido. La longitud máxima de los ejemplares adultos alcanza los 60 cm y, excepcionalmente, llega a los 90 cm. Su peso oscila entre 2-4 kg, pudiendo llegar a 10 kg.

Ecología

Esta especie se puede encontrar en el Océano Atlántico, desde Noruega a Senegal, en el Mar Mediterráneo y en el Mar Muerto (Fig. 2). Los mágiles son peces eurihalinos y, en un grado apreciable, euritermos.

Estos peces, aún siendo marinos, pueden ocupar una gran diversidad de biotopos, entre los que se encuentran las aguas salobres de los estuarios, e incluso pueden aparecer en tramos bajos y medios de algunos ríos, aunque lo más frecuente es encontrarlos en la desembocadura. Soportan una dosis



Fig. 2. Principales áreas de distribución geográfica del mágil (*Chelon labrosus* R.)

importante de contaminación orgánica e inorgánica, siendo una de las pocas especies que sobreviven en aguas residuales o degradadas por el vertido de aceites y residuos industriales; de ahí que puedan encontrarse en las proximidades de las alcantarillas,

puertos industriales, vertederos animales, etc.

No poseen dientes, y toda la materia animal que ingieren, así como vegetales, los trituran en una región especial del estómago fuertemente musculosa. Normalmente se alimentan de gusanos, algas, detritus y diatomeas que filtran de la arena, y la alimentación la realizan sólo durante el día. La freza se produce de diciembre a marzo en el Mediterráneo, y de enero a abril en el norte.

SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE PECES TELEÓSTEOS

El conocimiento del desarrollo embrionario del sistema nervioso central (SNC) resulta imprescindible para comprender la organización y el funcionamiento de éste. Si bien la mayor parte de los trabajos realizados se centran en la ontogenia del SNC de mamíferos, en las últimas décadas comenzaron a destacar aquéllos que se refieren a la evolución y desarrollo del encéfalo, o partes concretas de éste, de teleósteos, y de peces en general.

Los primeros estudios se centraron en las regiones del encéfalo de las cuales derivaban algunos núcleos (Palmgren, 1921; Bergqvist y Källén, 1954); posteriormente, se describió no sólo el origen, sino también la diferenciación y el patrón de conexiones de estos núcleos a lo largo del desarrollo. Algunas de estas investigaciones se han referido a la morfogénesis del diencéfalo (Chanconie y Clairambault, 1975; Corujo y Anadón, 1986, 1990), techo óptico (Pinganaud, 1980; Mansour-Robaey y Pinganaud, 1990), cerebelo (Pouwels, 1978a, b, c, d, e) y el sistema hipotálamo-hipofisario en salmónidos.

La organización neuroanatómica del encéfalo de individuos adultos ha sido objeto de numerosos estudios y las descripciones del SNC de peces teleósteos son abundantes (Goldstein, 1905; Kappers, 1906; Sheldon, 1912; Kappers y col., 1936; Davis y Northcutt, 1983; Meek y Nieuwenhuys, 1998).

El SNC de teleósteos, al igual que en el resto de los vertebrados, se origina a partir de una invaginación del ectodermo de la región dorsal del embrión (placa neural). Esta invaginación, inducida por la notocorda subyacente, progresa y termina por constituir el tubo neural o neurotubo, al fusionarse sus bordes. De esta estructura surgirán, tras una serie de modificaciones, el encéfalo y la médula espinal.

Inicialmente tiene lugar una dilatación o ensanchamiento del tubo neural en su posición más rostral, formándose una vesícula, de la que derivará el futuro encéfalo. El resto del neurotubo apenas sufre modificaciones, dando origen a la médula espinal.

La vesícula encefálica crece en sentido longitudinal y se estrangula en varios puntos, apareciendo, como consecuencia y en un principio, tres vesículas. La vesícula encefálica anterior, el prosencéfalo, dará origen al telencéfalo y al diencéfalo. La segunda vesícula encefálica, el mesencéfalo, no se subdivide más, pero se desarrolla para dar el cerebro medio. La tercera vesícula, el rombencéfalo, originará el metencéfalo (cerebelo y puente) y el mielencéfalo (bulbo raquídeo) al final del desarrollo embrionario.

Por su parte el tubo neural altera su configuración rectilínea ya que sufre una serie de expansiones que darán lugar a los ventrículos. Los ventrículos I y II quedan alojados en cada uno de los hemisferios telencefálicos; sin embargo, en peces actinoptergios ambos ventrículos se fusionan originando un único ventrículo alojado entre los lóbulos telencefálicos. El ventrículo III se localiza en el interior del diencéfalo, mientras que el IV se encuentra en el mielencéfalo, comunicando finalmente con el canal medular.

El sistema nervioso central de teleósteos está formado por el encéfalo y la médula espinal (Fig. 3). En el encéfalo adulto se distinguen, al igual que en el resto de vertebrados, cinco estructuras o regiones surgidas durante la ontogenia a partir de la vesícula encefálica; estas regiones en sentido rostro-caudal son: telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, cerebelo y bulbo raquídeo. Las dos primeras regiones, telencéfalo y diencéfalo, constituyen el cerebro anterior, mientras que el mesencéfalo y el bulbo raquídeo forman el tallo o tronco cerebral.

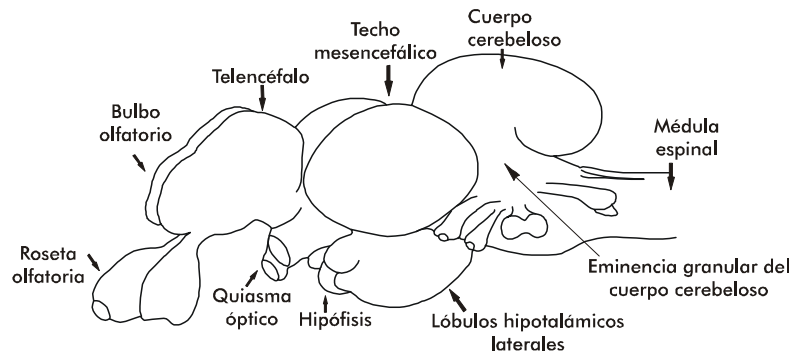


Fig. 3. Representación esquemática del encéfalo y parte rostral de la médula espinal de teleosteos, mostrando sus diferentes partes o subdivisiones

Telencéfalo

El telencéfalo es la parte más rostral del encéfalo y comprende los bulbos olfatorios y los hemisferios telencefálicos. En la mayoría de vertebrados, el telencéfalo se origina a partir del tubo neural por un proceso de evaginación, lo que da lugar a unos hemisferios telencefálicos tubulares; sin embargo, los peces actinoptergios poseen un telencéfalo evertido como resultado de una curvatura lateral del telencéfalo dorsal, lo que da lugar a unos hemisferios telencefálicos macizos en los que la superficie ventricular se dispone medialmente. En los hemisferios telencefálicos pueden distinguirse dos regiones: el área ventral telencefálica y el área dorsal telencefálica, equivalentes al subpalio y palio de otros vertebrados, respectivamente (Källén, 1951; Nieuwenhuys, 1963).

Los bulbos olfatorios constituyen la parte más rostral del telencéfalo y se forman por evaginación de la parte anterior de los hemisferios telencefálicos. Los bulbos olfatorios están estrechamente relacionados con la mucosa olfatoria por medio del nervio olfatorio (nervio I). En peces teleosteos, los bulbos olfatorios pueden estar unidos a los hemisferios telencefálicos bien directamente (bulbos olfatorios sésiles) como en el caso de la trucha o pez cebra, o por medio de un pedúnculo o tracto olfatorio (bulbos olfatorios pedunculados) como en el caso del mágil.

Histológicamente, los bulbos olfatorios de peces óseos presentan una organización laminar concéntrica, en la que se diferencian las siguientes capas (de la más externa a la más interna): capa de las fibras olfatorias primarias, capa glomerular, capa celular externa, capa de las fibras olfatorias secundarias, capa celular interna y capa endimaria. Las fibras aferentes, también denominadas fibras olfatorias primarias,

proceden de los receptores sensoriales primarios localizados en la mucosa olfatoria y forman el nervio olfatorio. La mayor parte de estas fibras terminan exclusivamente en los glomérulos olfatorios, donde establecen sinapsis con las dendritas de las células eferentes, mitrales y periglomerulares del bulbo, constituyendo de este modo la capa glomerular. La capa celular externa está constituida por células eferentes de gran tamaño denominadas mitrales y por otras de menor tamaño denominadas periglomerulares. Kosaka y Hama (1979, 1981) en *Carassius auratus* describieron otro tipo celular en esta capa, al que denominaron célula “ruffed”, la cual también fue demostrada en salmónidos (Alonso y col., 1987), aunque en mágiles no se ha descrito. La principal característica de estas células son sus axones cortos, llenos de apéndices colaterales que establecen sinapsis con las dendritas de las células granulares (de la capa celular interna). Los axones de las células eferentes constituyen la capa de las fibras olfatorias secundarias. La capa celular interna, o capa de células grano, está constituida por neuronas que mayoritariamente carecen de axones, aunque de su cuerpo celular parten dendritas apicales que establecen sinapsis con las células mitrales y con las células “ruffed” por una parte, así como con fibras ascendentes telencefálicas y diencefálicas.

Las proyecciones olfatorias secundarias del bulbo olfatorio se agrupan en dos tractos: el tracto olfatorio medial y el tracto olfatorio lateral; ambos asociados a la transmisión de señales relacionadas con el olor de la comida y con las feromonas en diversos peces teleósteos (Fujita y col., 1991; Sorensen y col., 1991). El tracto olfatorio lateral proyecta al área dorsal telencefálica, mientras que el tracto olfatorio medial, que contiene fibras del nervio terminal y proyecciones olfatorias primarias extrabulbares, proyecta fundamentalmente al área ventral telencefálica (Becerra y col., 1994). Mediante el uso de trazadores se puso de manifiesto en diversas especies de teleósteos que son las células mitrales y, posiblemente, las células “ruffed” el origen de tales eferencias bulbares (Ichikawa, 1975; Oka, 1980; Prasada-Rao y Finger, 1984; Levine y Dethier, 1985; Rooney y col., 1989; Honkanen y Ekström, 1990; Sas y col., 1990). Un estudio posterior (Matz, 1995) confirmó que no sólo las células mitrales sino también las células “ruffed” y las células granulares, proyectaban fuera del bulbo. Los bulbos olfatorios no sólo reciben información olfatoria primaria a través del nervio olfatorio, sino también información ascendente de regiones telencefálicas.

Asociado al sistema olfatorio se localiza una población de células ganglionares que forman el ganglio del nervio terminal, las prolongaciones centrales y periféricas de estas células constituyen el nervio terminal (nervio 0). También se ha denominado núcleo olfatorretinal, debido a su proyección a la retina (Münz y col., 1981). En peces teleósteos con bulbos olfatorios pedunculados, el ganglio del nervio terminal se localiza caudalmente al bulbo olfatorio (Springer, 1983; Stell y col., 1984), mientras que lo hace rostralmente al bulbo olfatorio en aquellas especies que poseen bulbos olfatorios sésiles (Münz y col., 1982). En teleósteos con bulbos olfatorios pedunculados se pueden distinguir dos tipos celulares, con proyecciones diferentes. El primer tipo contacta con el epitelio olfatorio y proyecta al telencéfalo, mientras que el segundo tipo no contacta con el epitelio olfatorio y proyecta a la retina. En teleósteos con bulbos olfatorios sésiles también se distinguen dos tipos celulares, cuyo tamaño y características difieren, aunque ambos tipos proyectan a la retina. Así, las células de mayor tamaño contienen vesículas neurosecretoras (Matsutani y col., 1986), presentando inmunorreactividad a la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) o a la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH; Münz y col., 1982; Kudo y col., 1994) y al péptido FMRF-amida (Ekström y col., 1988; Uchiyama, 1990; Rama Krishna y col., 1992); sin embargo, las células de menor tamaño, que se concentran en la parte ventral del ganglio, carecen de vesículas neurosecretoras (Matsutani y col., 1986) y su inmunorreactividad para la GnRH, LHRH y FMRF-amida es escasa o nula (Uchiyama, 1990).

El significado funcional del nervio terminal no está claramente determinado, aunque hay evidencias de que éste puede estar implicado en la detección o percepción de feromonas y en la mediación del comportamiento sexual (Demski y Northcutt, 1983).

El área ventral telencefálica constituye la parte no evertida del telencéfalo, y puede dividirse en una porción rostral (anterior) y otra caudal (posterior), representando la comisura anterior el límite entre ambas. En la porción rostral del área ventral telencefálica se distinguen varios núcleos: dos núcleos periventriculares (ventral, Vv; y dorsal, Vd), un núcleo lateral (Vl) y otro central (Vc). Vv se extiende desde el bulbo olfatorio hasta alcanzar caudalmente la comisura anterior. A nivel más dorsal, Vv es sustituido por Vd. Vl se dispone a lo largo de la superficie lateral de la mitad rostral del telencéfalo. En la porción caudal del área ventral telencefálica se

distinguen varios núcleos: dos núcleos periventriculares (supracomisural, Vs; y postcomisural, Vp) y un núcleo lateral o entopeduncular (Ent). Vs sustituye al Vd a nivel de la comisura anterior y éste es, a su vez, reemplazado por Vp. En teleósteos, el complejo entopeduncular está poco desarrollado, apareciendo como un único núcleo constituido por células de pequeño tamaño o por dos o más subnúcleos. En *Lepomis* (Demski y Knigge, 1971) y otros teleósteos se distingue además un núcleo intermedio (Vi). Éste se encuentra constituido por células densamente empaquetadas rodeando medialmente el núcleo de la tenia. Aunque Vi no ha podido ser reconocido como tal en *Salmo* (Northcutt y Braford, 1980), éste podría estar representado por la porción ventromedial de la zona posterior del área dorsal telencefálica.

El área dorsal telencefálica constituye la región más grande del telencéfalo de peces teleósteos y también la que muestra mayores variaciones. Inicialmente se establecieron cuatro zonas longitudinales (Nieuwenhuys, 1963): medial (Dm), lateral (Dl), dorsal (Dd) y central (Dc). Posteriormente se describió una quinta zona (Northcutt y Braford, 1980), la zona posterior (Dp) que, en parte, se corresponde a la porción posterior de la zona lateral de Nieuwenhuys. La zona lateral del área dorsal es extensa y, al menos, presenta tres subdivisiones diferentes (Nieuwenhuys, 1963; Northcutt y Braford, 1980): la dorsal (Dl-d), la ventral (Dl-v) y la posterior (Dl-p). Dl-d presenta células de tamaño medio orientadas en columnas perpendiculares a la superficie endodimal. Dl-v está constituida por células más pequeñas, mientras que Dl-p se caracteriza por presentar células empaquetadas más densamente a nivel caudal. La zona dorsal se halla entre la zona medial y la zona lateral del área dorsal. En la zona central del área dorsal de teleósteos se distinguen hasta cuatro subdivisiones (Northcutt y Braford, 1980). La zona posterior es el principal objetivo de las fibras olfatorias secundarias y se dispone lateralmente a la superficie endodimaria. Asociado a Dp aparece el núcleo de la tenia, constituido por células densamente empaquetadas.

Las aferencias o proyecciones que llegan al telencéfalo se pueden clasificar en olfatorias y no olfatorias. Las olfatorias llegan a través de los tractos olfatorios medial y lateral desde la capa celular externa del bulbo olfatorio. El tracto olfatorio medial está constituido por fibras ipsilaterales que se dirigen caudalmente, a través del área ventral telencefálica, hasta alcanzar el área preóptica, donde establecen

sinapsis con las dendritas de las neuronas del preóptico, para terminar en el tubérculo posterior. El tracto olfatorio lateral discurre a lo largo del margen ventrolateral de los hemisferios telencefálicos, terminando algunas de sus fibras en el propio VI (Murakami y col., 1983), para alcanzar caudalmente los núcleos intermedios y central del área ventral, y la zona posterior (Dp) y núcleo de la tenia del área dorsal. Respecto a las aferencias del tipo no olfatorio, éstas proceden de diferentes núcleos del diencefalo (núcleos talámicos, complejo preglomeruloso y tubérculo posterior), así como del *locus coeruleus* y rafe superior (Echteler y Saidel, 1981).

Las eferencias telencefálicas, o proyecciones del telencéfalo, alcanzan diferentes regiones encefálicas como bulbo olfatorio, tálamo, hipotálamo, pretecho, techo óptico y tronco cerebral (Striedter, 1990b; Rink y Wullimann, 1998).

Diencefalo

Se localiza entre el telencéfalo y el mesencéfalo, y su cavidad está constituida por el tercer ventrículo. Rostralmente, su límite dorsal es el velo transversal y su límite ventral la comisura anterior; caudalmente, su límite dorsal es la comisura posterior y su límite ventral viene representado por las porciones caudales del complejo preglomeruloso. A lo largo de su recorrido hipotalámico el tercer ventrículo emite una serie de recesos: el receso preóptico, el receso tuberal, el receso lateral y el receso posterior. Tradicionalmente han sido tres las subdivisiones distinguidas en el diencefalo de vertebrados (His, 1983): hipotálamo, tálamo y epitálamo. Posteriormente se dividió en cuatro zonas longitudinales, que en sentido dorsoventral son: epitálamo, tálamo dorsal, tálamo ventral e hipotálamo. Estudios embriológicos del cerebro de anamniotas (Bergqvist, 1932) y citoarquitectónicos del diencefalo y pretecho de juveniles y adultos de actinopterigios (Braford y Northcutt, 1983) han permitido diferenciar en el diencefalo las siguientes regiones: área preóptica, hipotálamo, tubérculo posterior, región talámica (dorsal y ventral), epitálamo y pretecho.

Área preóptica

El área preóptica deriva embriológicamente del telencéfalo, aunque se considera una subdivisión del diencefalo debido a las relaciones funcionales y anatómicas que mantiene con el hipotálamo. Así, Johnston (1911) asignó el área preóptica al

telencéfalo, mientras que Herrick (1948) y otros autores la han considerado como una región diencefálica.

La porción prosencefálica que rodea al receso preóptico del tercer ventrículo constituye el área preóptica. Se sitúa rostralmente al quiasma óptico, siendo la comisura anterior su límite rostral, y la comisura postóptica su límite caudal. A lo largo de su límite dorsal se dispone por debajo del núcleo postcomisural telencefálico, a nivel rostral, y bajo el tálamo ventral caudalmente. La parte lateral del área preóptica contiene numerosos tractos de fibras, mientras que los cuerpos celulares se disponen medialmente.

Las porciones rostral y caudal del área preóptica periventricular presentan células de pequeño tamaño; sin embargo, la porción intermedia contiene células neurosecretoras de gran tamaño. Braford y Northcutt (1983) diferenciaron cuatro núcleos en el área preóptica de actinoptergios: el núcleo preóptico parvocelular anterior, el núcleo preóptico magnocelular, el núcleo preóptico parvocelular posterior y el núcleo supraquiasmático.

El núcleo preóptico parvocelular anterior constituye el más rostral de los núcleos del área preóptica, al localizarse tras la comisura anterior. Ventralmente al núcleo preóptico parvocelular anterior se localiza el órgano vasculoso de la lámina terminal, un órgano neurohemal. El principal núcleo del área preóptica es el núcleo preóptico magnocelular, equivalente al núcleo preóptico de Peter y Gill (1975). Se encuentra íntimamente relacionado con la actividad hipofisiaria al presentar sus células carácter secretor y producir y liberar dos nonapéptidos: isotocina y vasotocina (Reaves y Hayward, 1979, 1980; Van den Dungen y col., 1982; Holmqvist y Ekström, 1991, 1995). En este núcleo se distinguen dos porciones, una rostroventral constituida por células de pequeño tamaño (porción parvocelular) y otra dorsocaudal constituida por células de gran tamaño (porción magnocelular). Las prolongaciones axónicas de las neuronas del núcleo preóptico magnocelular constituyen el tracto preóptico-hipofisiario que se extiende por el suelo del hipotálamo hasta alcanzar la hipófisis.

El núcleo preóptico parvocelular posterior, también denominado núcleo periventricular anterior por Batten y col. (1990a, b), se localiza caudalmente al núcleo preóptico magnocelular. Este núcleo presenta inmunorreactividad a la

sustancia P (Vecino y col., 1989) y a la tirosina hidroxilasa (Yoshida y col., 1983; Ekström y col., 1990; Manso y col., 1993). El núcleo supraquiasmático se localiza dorsalmente al quiasma óptico y no siempre es distinguible como un núcleo separado, pudiendo ser incluido en el núcleo preóptico parvocelular posterior (Gómez-Segade y Anadón, 1988). Estos últimos dos núcleos, el núcleo preóptico parvocelular posterior y el núcleo supraquiasmático, equivalen al núcleo periventricular anterior de Peter y Gill (1975).

La zona preóptica parece estar implicada en el comportamiento sexual y en la mediación de conductas agresivas. Las aferencias retinales que alcanzan la región preóptica terminan en el núcleo parvocelular posterior y en el núcleo supraquiasmático, mientras que las procedentes de los bulbos olfatorios terminan exclusivamente en el núcleo preóptico parvocelular anterior.

Hipotálamo

El hipotálamo es una estructura muy conservada a lo largo de la evolución. También se conoce como “cerebro visceral”, ya que es el encargado de generar y regular una serie de procesos biológicos (sensación de hambre, sed, temperatura corporal) y comportamientos emocionales (agresivos, sexuales) con el fin de mantener la supervivencia del individuo y de la especie. En peces teleósteos ha alcanzado un grado de complejidad comparable al de mamíferos, siendo la región más desarrollada del diencefalo.

La presencia del quiasma óptico permite distinguir entre un hipotálamo anterior o área preóptica (anteriormente descrita) y un hipotálamo posterior o postóptico (hipotálamo propiamente dicho).

El hipotálamo constituye la región más ventral del diencefalo, limitando rostralmente con el área preóptica y caudalmente con el tegmento mesencefálico. La cavidad del hipotálamo, el receso infundibular, emite rostralmente el receso tuberal, a niveles mediales emite dos divertículos laterales (recesos de los lóbulos hipotalámicos inferiores) y caudalmente emite el receso posterior, en el cual se observan dos pequeños divertículos y cuya cavidad se continúa con la del saco vasculoso. El hipotálamo de teleósteos puede dividirse en tres regiones (Braford y Northcutt, 1983; Striedter, 1990a): una zona periventricular, una zona tuberal (localizada

medialmente) y los lóbulos inferiores hipotalámicos (localizados lateralmente).

La zona periventricular está constituida por células de pequeño tamaño y muy densamente empaquetadas que contactan con el infundíbulo y sus recesos. En ésta se distinguen dos núcleos: el núcleo de los recesos laterales y el núcleo del receso posterior (Peter y Gill, 1975; Gómez-Segade y Anadón, 1988; Meek y col., 1989; Rama Krishna y Subhedar, 1991). Ambos núcleos constituyen la porción hipotalámica del órgano paraventricular, mientras que la otra porción de este órgano pertenece al tubérculo posterior. Diversos estudios inmunohistoquímicos han demostrado la naturaleza aminérgica (Ekström y Van-Veen, 1984; Frankenhuis-Van den Heuvel y Nieuwenhuys, 1984; Ekström y Ebbesson, 1989; Batten y col., 1993) y peptidérgica (Sharma y col., 1989; Holmqvist y Ekström, 1991; Vecino y col., 1992) del órgano paraventricular de algunas especies de teleósteos y en múgil las neuronas de ambos núcleos son monoaminérgicas (Gómez-Segade y col., 1989).

Localizada caudalmente al quiasma óptico y mediorostralmente a los lóbulos inferiores hipotalámicos aparece la región hipotalámica tuberal como un tubérculo medial sobre la superficie ventral del diencefalo. En ésta se distinguen el núcleo anterior del túber y el núcleo lateral del túber; sin embargo, aunque Le Gross Clark (1938) también diferencia el núcleo posterior del túber, diversos autores lo consideran como perteneciente al tubérculo posterior. El núcleo anterior del túber está implicado en el procesamiento de la información acústicolateral y posee conexiones recíprocas con el toro semicircular (parte mecanorreceptora), el diencefalo (parte mecanorreceptora), el telencéfalo (área dorsal) y la región preóptica. El núcleo lateral del túber y el núcleo preóptico magnocelular constituyen los dos centros neurosecretores clásicos del diencefalo. En teleósteos evolucionados se reconoce una única agrupación tuberal, el núcleo lateral del túber (Gómez-Segade y Anadón, 1988), que incluye el núcleo ventral del túber de Sheldon (1912) y el lateral de Braford y Northcutt (1983).

Los lóbulos hipotalámicos inferiores, la mayor región del hipotálamo de teleósteos, se localizan laterocaudalmente a la región hipotalámica tuberal y comprenden la parte distal de los recesos laterales, rodeada por el núcleo de los recesos laterales de los lóbulos hipotalámicos (hipotálamo periventricular), un núcleo central bastante compacto, y el núcleo difuso de los lóbulos hipotalámicos inferiores localizado

lateral y ventralmente (Peter y Gill, 1975; Braford y Nothcutt, 1983; Gómez-Segade y Anadón, 1988). Los lóbulos hipotalámicos inferiores se han relacionado con la alimentación y la agresividad (Demski y Knigge, 1971).

Asociadas al hipotálamo destacan dos estructuras de gran interés, la hipófisis y el saco vascular. La hipófisis o glándula pituitaria es un importante centro de distribución, almacenaje y liberación hormonal, cuya regulación depende de las hormonas hipofisiotrópicas secretadas por neuronas especializadas del área preóptica y del hipotálamo. Está conectada con el hipotálamo mediante el tallo de la pituitaria, que contiene fibras nerviosas preópticas e hipotalámicas implicadas en funciones regulatorias neuroendocrinas. Situada ventralmente al hipotálamo, está formada por dos partes de estructura y desarrollo diferente, la adenohipófisis y la neurohipófisis (Peter y Fryer, 1983), entre las que existe un plexo vascular; sin embargo, en teleósteos no hay un portal definido entre ambas, lo cual se relaciona con la ausencia de eminencia media diferenciada. La adenohipófisis (parte epitelial de la hipófisis) deriva del ectodermo oral y en ella puede diferenciarse una parte anterior denominada pars distalis y una parte posterior, la pars intermedia. A su vez, la pars distalis se subdivide en la pars distalis rostral y la pars distalis proximal, en esta última se encuentran las células productoras de la hormona del crecimiento y gonadotropinas.

El saco vascular es una estructura altamente especializada característica de los peces cartilaginosos y de la mayor parte de los peces óseos. Consiste en una lámina epitelial simple, que está altamente vascularizada, en la que se distinguen varios tipos celulares: células en corona, células de soporte y neuronas líquido cefalorraquídeo-contactantes (Zimmermann y Altner, 1970; Vigh-Teichmann y Vigh, 1989; Corujo y Anadón, 1990) y en el múgil son catecolaminérgicas (Gómez-Segade y col., 1989). Entre las células del saco se encuentran haces de fibras eferentes que se reúnen para formar el tracto del saco vascular, el cual alcanza el tubérculo posterior y el tálamo (Yáñez y col., 1997). El saco vascular recibe aferencias del núcleo del saco vascular, localizado dorsomedialmente a los recesos laterales (Vigh y col., 1972; Braford y Northcutt, 1983).

Tubérculo posterior

El tubérculo posterior, junto con el pretecho, constituye la zona de transición entre el diencéfalo y el mesencéfalo. Se localiza, rostralmente, entre ambos tálamos (dorsal y ventral), y caudalmente entre el núcleo del fascículo longitudinal medial (límite dorsal) y el hipotálamo (límite ventral). El tubérculo posterior ha sido considerado como una subdivisión del tálamo (Bergqvist, 1932), aunque Miller (1940) lo ha incluido dentro del hipotálamo. Está constituido por varios núcleos periventriculares, que forman el tubérculo posterior periventricular, y una serie de núcleos migrados, que sólo están presentes en peces (Braford y Northcutt, 1983; Meek y Nieuwenhuys, 1998).

Dentro de las poblaciones neuronales periventriculares se diferencian: el núcleo periventricular del tubérculo posterior, el órgano paraventricular, el núcleo del órgano paraventricular y el núcleo posterior del túber. El núcleo paraventricular del tubérculo posterior es el más rostral de todos, recibe aferencias cerebelosas y proyecta al telencéfalo. El órgano paraventricular (órgano circunventricular) constituye una especialización del epéndimo situada en el límite con el hipotálamo, constituido por neuronas líquido cefalorraquídeo-contactantes y que, al igual que en otros peces, presenta dopamina y serotonina en salmónidos (Frankenhuys-Van den Heuvel y Nieuwenhuys, 1984; Ekström y Ebbesson, 1989; Manso y col., 1993). El núcleo del órgano paraventricular se localiza lateralmente a la parte anterior del órgano paraventricular (Braford y Northcutt, 1983); desde sus células asoman largos tractos de fibras tirosina hidroxilasa-positivas, lo que sugiere que este núcleo es el responsable de gran parte de la innervación dopaminérgica del cerebro de teleósteos. El núcleo posterior del túber, denominado núcleo del saco vasculoso por Bergqvist (1932), presenta carácter aminérgico en diversos teleósteos (Hornby y Piekut, 1990; Ekström y col., 1990; Meek y Joosten, 1993; Manso y col., 1993), así como conexiones con el bulbo olfatorio (Levine y Dethier, 1985) y con otras regiones del telencéfalo (Shiga y col., 1985a, b; Striedter, 1990b).

Los núcleos migrados forman una columna de células que se extiende a lo largo del diencéfalo basal, desde posiciones rostrolaterales a caudomediales, en la que destacan las siguientes agrupaciones celulares: el núcleo glomeruloso, el complejo preglomeruloso, los núcleos caudomediales y los núcleos aislados (Braford y

Northcutt, 1983).

El complejo preglomeruloso está presente tanto en teleósteos evolucionados como en teleósteos primitivos, aunque su grado de desarrollo y la terminología utilizada varían de unas especies a otras. El complejo preglomeruloso ha sido dividido en dos partes: una más rostral, denominada complejo preglomeruloso lateral, y otra más caudal, el complejo preglomeruloso medial. Este último se relaciona con la información acústica y mecanosensorial, y puede subdividirse en un núcleo preglomeruloso anterior y un núcleo preglomeruloso posterior. Sin embargo, diferentes autores distinguen tres agrupaciones celulares dentro del complejo preglomeruloso: el núcleo preglomeruloso, el núcleo pseudoglomeruloso y el núcleo supraglomeruloso (García y Anadón, 1977; Gómez-Segade y Anadón, 1988).

En la parte caudal de la columna de agrupaciones neuronales migradas se localizan los núcleos caudomediales: el núcleo preglomeruloso comisural y el cuerpo mamilar (Peter y Gill, 1975), este último, muy desarrollado en peces evolucionados, constituye la parte más caudal del complejo preglomeruloso. El cuerpo mamilar de teleósteos no es homólogo del cuerpo mamilar de mamíferos y, en ciprínidos, recibe entradas visuales desde el núcleo pretectal superficial.

Los núcleos aislados, así denominados por no tener relación alguna con el complejo preglomeruloso, están constituidos por el núcleo subglomeruloso, el núcleo posterior del tálamo, situado lateralmente al anterior, y el núcleo lateral del tálamo, localizado lateralmente a la parte caudal del núcleo subglomeruloso y caudalmente al núcleo posterior del tálamo (García y Anadón, 1977; Gómez-Segade y Anadón, 1988).

En la superficie lateral de la parte caudal del diencéfalo destaca una prominente protuberancia denominada toro lateral del hipotálamo. El toro lateral es más rostral y pequeño en los peces teleósteos que en los no teleósteos, y en los teleósteos evolucionados incluso puede estar ausente (Gómez-Segade y Anadón, 1988). Dentro de él se ha descrito el núcleo del toro lateral (Palmgren, 1921). El toro lateral está relacionado con el núcleo difuso de los lóbulos hipotalámicos inferiores, aunque parece pertenecer parcialmente al tubérculo posterior (Bergqvist, 1932).

Tálamo

El tálamo constituye las paredes laterales del diencefalo, situándose ventralmente al epitálamo. El tálamo de peces teleósteos muestra un grado de desarrollo mayor que el de ciclóstomos y anfibios urodelos, presentando una notable diferenciación en núcleos neuronales, en su mayoría relacionados con el sistema visual.

El tálamo dorsal limita dorsalmente con el epitálamo y con el pretecho periventricular, y ventralmente con el tálamo ventral y el tubérculo posterior. Caudalmente se extiende hasta el núcleo del fascículo longitudinal medial, constituyendo un centro de relevo de aferencias telencefálicas. En diversos peces teleósteos se reconocen tres agrupaciones celulares en posición periventricular: el más rostral es el núcleo anterior, el cual es reemplazado por el núcleo posterior dorsal, dorsalmente, y por el núcleo posterior central, ventralmente (Braford y Northcutt, 1983). Sin embargo en otros teleósteos tan sólo se ha descrito un único núcleo que abarca todo el tálamo dorsal, denominado núcleo dorsal (Frankenhuys-Van den Heuvel y Nieuwenhuys, 1984) o núcleo dorsomedial (Gómez-Segade y Anadón, 1988).

El tálamo ventral se encuentra situado dorsalmente al área preóptica, ventralmente al tálamo dorsal y anteriormente al tubérculo posterior. Se ha relacionado con el procesamiento de la información sensorial y con el control de los sistemas motores. En la mayoría de los teleósteos se han descrito tres núcleos en esta región: el núcleo ventromedial, el núcleo ventrolateral, y el núcleo intermedio (Braford y Northcutt, 1983; Meek, 1998). Además, la porción rostral del tálamo ventral, denominada eminencia talámica, ha sido considerada como un cuarto núcleo en la carpa (Braford y Northcutt, 1983). Esta porción está constituida por un escaso grupo de células de pequeño tamaño situadas en posición periventricular. El principal núcleo del tálamo ventral es el núcleo ventromedial, el cual está formado por una columna de células que se extiende desde la eminencia talámica hasta el órgano paraventricular. Este núcleo comprende el núcleo ventromedial y la parte rostroventral de los núcleos dorsomedial y dorsolateral de Schnitzlein (1962) y de Peter y Gill (1975). El núcleo intermedio se localiza dorsalmente al núcleo ventromedial, con el cual parece estar íntimamente relacionado, y se corresponde con la porción rostrocaudal de los núcleos dorsomedial y dorsolateral de Schnitzlein (1962) y de Peter y Gill (1975). Sin

embargo, algunos autores se han referido a todo el tálamo ventral como núcleo ventral (Frankenhuys-Van den Heuvel y Nieuwenhuys, 1984) o como núcleo ventromedial (Gómez-Segade y Anadón, 1988). Además de estos núcleos mediales, el tálamo de la mayoría de los teleósteos presenta una serie de núcleos migrados lateralmente.

Epitálamo

El epitálamo ocupa la región dorsal del diencefalo, constituyendo el techo del tercer ventrículo. Se localiza dorsalmente al tálamo ventral y rostralmente al tálamo dorsal. El epitálamo de actinopterigios comprende el saco dorsal, las habénulas, la comisura habenular, el complejo pineal y la comisura posterior con el órgano subcomisural (órgano circunventricular).

Las habénulas están situadas en la zona medial. En la mayoría de los teleósteos son asimétricas, diferenciándose en cada una de ellas dos núcleos, uno dorsal y otro ventral (Braford y Northcutt, 1983). Ambas habénulas se unen entre sí a través de la comisura habenular. El principal tracto eferente de las habénulas es el fascículo retroflexo que, recorriendo caudoventralmente el diencefalo y mesencefalo, alcanza el núcleo interpeduncular y el rafe (Villani y col., 1987; Yáñez y Anadón, 1996). Por su parte, cada habénula recibe fibras de diferente origen, principalmente del telencefalo ventral, hipotálamo, área preóptica, tálamo y epífisis. El gran desarrollo habenular en aquellas especies con un sentido del olfato altamente especializado, pone de manifiesto la íntima relación de esta estructura con el sistema olfatorio.

El complejo pineal, localizado en la zona medial, está compuesto por el órgano pineal o epífisis y por el órgano parapineal. La epífisis es un órgano fotorreceptor impar, implicado en la sincronización de los ritmos circadianos (Ekström, 1987b), que se encuentra conectado con la habénula a través del tallo epifisiario.

En la zona de transición entre el diencefalo y el mesencefalo se encuentran la comisura posterior (vía de paso de fibras de orígenes diferentes) y el órgano subcomisural (órgano circunventricular). Este último es una estructura endimaria que forma un arco sobre el tercer ventrículo y que produce una secreción ventricular, la fibra de Reissner.

Pretecho

El pretecho, al igual que el tubérculo posterior, es una zona de transición entre el diencéfalo y el mesencéfalo. Se sitúa entre el tálamo dorsal y el techo óptico. Funcionalmente es considerado como una región visual primaria, ya que recibe fibras visuales primarias (procedentes de la retina) y fibras visuales secundarias (procedentes del techo óptico). Además, algunas entradas no visuales (por ejemplo, telencefálicas) pueden ser relevadas a uno o más blancos pretectales (por ejemplo, cerebelo). En la mayor parte de los actinopterigios, el pretecho comprende tres regiones: el pretecho periventricular (que se corresponde con parte del sinencéfalo de Braford y Northcutt, 1983), el pretecho superficial y el pretecho central.

El pretecho periventricular, en las proximidades del fascículo retroflexo, presenta dos núcleos: el núcleo periventricular ventral y el núcleo periventricular dorsal. El primero de ellos se sitúa por debajo del órgano subcomisural, mientras que el segundo es más caudal y se localiza en posición dorsal al núcleo del fascículo longitudinal medial. Los núcleos periventriculares dorsal y ventral también han sido descritos conjuntamente como núcleo de la comisura posterior, debido a su posición con respecto a ésta. Además, en peces evolucionados, pero no en ciprínidos, se ha descrito una tercera agrupación, el núcleo paracomisural, situado dorsalmente al núcleo pretectal periventricular dorsal.

La zona pretectal superficial, que se localiza cercana a la superficie y lateralmente al pretecho central, está ausente en aquellos teleósteos con capacidad visual reducida como mormíridos e ictalúridos (Striedter, 1990a, b; Wullimann y Northcutt, 1990). En el pretecho superficial se distingue el núcleo pretectal superficial, el cual presenta dos porciones, una parvocelular y otra magnocelular. El núcleo pretectal superficial parvocelular (cuerpo geniculado lateral de Nieuwenhuys y Bodenheimer, 1966) recibe entradas de la retina y del techo óptico, por lo que se considera un centro de relevo visuo-hipotalámico. El núcleo pretectal superficial magnocelular (núcleo rotundo de Schnitzlein, 1962) se localiza caudalmente al parvocelular y está formado por células de mayor tamaño. Recibe principalmente proyecciones tectales, con algunas entradas del tegmento mesencefálico (núcleo ruber) y de la región preglomerular (núcleo rotundo) en ciprínidos. En peces evolucionados, y en posición ventral, aparece una tercera porción: el núcleo pretectal superficial intermedio, que

proyecta al núcleo glomeruloso y recibe entradas de la parte parvocelular (Wullimann y Meyer, 1990; Butler y col., 1991).

El pretecho central se localiza lateralmente al pretecho periventricular y rodea dorsal, medial y ventralmente al pretecho superficial. En esta zona se han descrito dorsoventralmente las siguientes poblaciones neuronales: el núcleo pretectal central, el núcleo pretectal posterior y dos núcleos ópticos accesorios. El núcleo pretectal central, también denominado núcleo pretectal óptico o área central, se sitúa dorsomedialmente al núcleo pretectal superficial magnocelular. Recibe fibras retinianas y, además, presenta conexiones recíprocas con el techo óptico proyectando al cerebelo. El núcleo pretectal posterior, o núcleo anterior del tálamo, ocupa una posición caudomedial al magnocelular, siendo el único que no recibe fibras retinianas. El núcleo óptico accesorio dorsal, localizado ventrolateralmente al núcleo pretectal posterior, recibe fibras retinianas y proyecta al techo óptico y cerebelo. El núcleo óptico accesorio ventral, localizado más medialmente respecto al anterior, recibe fibras retinianas. En teleósteos evolucionados, exceptuando los ciprínidos, se ha descrito una cuarta agrupación, el núcleo cortical, situada en la base del techo óptico y formada por grandes células acetilcolinesterasa-positivas, que recibe proyecciones de la retina y del techo óptico y que proyecta al núcleo pretectal posterior. El núcleo glomeruloso y el núcleo pretectal posterior han sido considerados como parte del tubérculo posterior; sin embargo, su patrón de conexiones con el área pretectal ha hecho que el núcleo glomeruloso se considere homólogo al núcleo pretectal posterior o núcleo anterior del tálamo (Wullimann y Meyer, 1990; Butler y col., 1991). Ambos núcleos ocupan posiciones ventrales a los núcleos de la zona pretectal superficial y central, presentando dos porciones (rostral y caudal) que contactan con otros núcleos pretectales. El núcleo glomeruloso está presente en peces actinopterigios y paracantopterigios, mientras que el núcleo anterior del tálamo (núcleo pretectal posterior) sólo en los teleósteos menos evolucionados; además, el núcleo glomeruloso presenta un neuropilo glomerular, que no es tan patente en el núcleo anterior del tálamo.

Mesencéfalo

El mesencéfalo se encuentra situado caudalmente al pretecho y tubérculo posterior. Está constituido por el techo mesencefálico (dorsalmente) y el tegmento

mesencefálico (ventralmente).

Techo óptico

El techo mesencefálico o techo óptico es la región del mesencéfalo implicada en el procesamiento de la información visual y en la integración de señales visuales con información sensorial, ya que es el principal receptor de las fibras ópticas. Así, es considerado como uno de los principales centros de integración de señales sensoriales así como de carácter motor de teleósteos. Su tamaño varía en función del presentado por los ojos, alcanzando en peces teleósteos su mayor desarrollo. Estructuralmente está constituido por dos masas ovoideas (denominadas hemitechos) que cubren dorsalmente el ventrículo del mesencéfalo y que se unen medialmente por medio de la comisura intertectal. Bajo esta comisura a lo largo del margen medial del techo se localiza el toro longitudinal, constituido por células granulares densamente empaquetadas, estando implicado en el procesamiento de la información visual y estática (Northmore, 1984; Guthrie, 1990). Histológicamente el techo óptico se caracteriza por su laminación, y en los teleósteos se diferencian seis capas concéntricas (Vanegas y col., 1974), cuyo grosor varía según el grupo y la especie considerada. Estas capas, en orden centrípeto, son:

- Estrato marginal (SM). Es el más superficial y presenta fibras amielínicas paralelas originadas en el toro longitudinal y que contactan con dendritas de neuronas bipolares.
- Estrato óptico (SO). Contiene el mayor volumen de las fibras retinianas. Presenta tres subcapas: pars superficial, pars intermedia y pars profunda. La pars superficial posee gran cantidad de axones mielínicos, cuyo posible origen es el propio techo. La pars profunda contiene aferencias retino-tectales. La pars intermedia, situada entre las dos anteriores, es rica en axones amielínicos, con un escaso número de axones mielínicos.
- Estrato fibroso y gris superficial (SFGS). Rico en axones mielínicos correspondientes a las terminaciones de las fibras retinianas del SO. La mayoría de sus neuronas son piramidales o piriformes, aunque también se encuentran neuronas horizontales y bipolares de pequeño tamaño.

- Estrato gris central (SGC). Puede subdividirse en una capa más superficial (capa plexiforme interna) y una capa más profunda con gran variedad de dendritas (biestratificadas o triestratificadas), axones y elementos neuronales (piriformes, fusiformes, multipolares y horizontales). Presenta escasos axones amielínicos. Las dendritas de las neuronas biestratificadas acaban en el SFGS y en el SGC representando interneuronas o neuronas que proyectan al techo mesencefálico. Las triestratificadas poseen axones mielínicos y sus dendritas descansan en tres capas: parte superficial del SFGS (reciben entradas visuales), parte superficial del SGC, y SFGS-SGC (reciben entradas no visuales). Sus axones proyectan al toro semicircular y a blancos localizados más caudalmente en el rombencéfalo.
- Estrato blanco central (SAC). Contiene el grueso de las fibras eferentes y los somas de las grandes células multipolares o ganglionares eferentes, cuyas dendritas muestran preferencia por el SO, SFGS-SGC y SAC. Sus axones son mielínicos y proyectan fuera del techo. Algunas dendritas de las células multipolares se restringen al SAC, representando un nuevo tipo de células horizontales del SAC.
- Estrato gris periventricular (SP). Es el más profundo y está formado por células monopolares, de cada una de las cuales parte un único y delgado proceso que asciende hacia las capas más superficiales del techo (SFGS y SO) donde se ramifica profusamente. Estas neuronas son periventriculares y están densamente empaquetadas, constituyendo la población más numerosa y variable de neuronas tectales.

Además de las fibras retinianas, el techo óptico recibe aferencias de otras partes del encéfalo (telencéfalo, diencefalo y rombencéfalo). Del techo óptico parten proyecciones hacia: pretecho, tálamo, toro longitudinal, techo contralateral y tegmento mesencefálico.

Tegmento mesencefálico

La región ventral del mesencéfalo la constituye el tegmento mesencefálico, en el que la mayoría de las agrupaciones neuronales se localizan en posiciones ventromediales

y periventriculares. Entre las poblaciones ventromediales destacan el núcleo del nervio oculomotor (nervio III), el núcleo del nervio troclear (nervio IV), el núcleo de Edinger-Westphal y el núcleo del fascículo longitudinal medial.

El núcleo oculomotor de teleósteos está formado por neuronas colinérgicas (Rhodes y col., 1986; Ekström, 1987a; Molist y col., 1993; Pérez y col., 2000; Clemente y col., 2004) que se disponen dorsomedialmente al fascículo longitudinal medial. Sus motoneuronas inervan ipsilateralmente varios músculos del ojo (músculos rectos medial e inferior y músculo oblicuo inferior) y contralateralmente el músculo recto superior. Las principales aferencias que recibe proceden de neuronas vestibulares (núcleo tangencial ascendente y núcleo octavolateral anterior); otras entradas se originan en el cuerpo cerebeloso, eminencias granulares cerebelosas posteriores, formación reticular del rombencéfalo, núcleo del fascículo longitudinal medial y núcleo pretectal.

Las motoneuronas del núcleo troclear se localizan dorsalmente al fascículo longitudinal medial y caudalmente al núcleo oculomotor. Sus células son colinérgicas (Ekström, 1987a; Molist y col., 1993; Pérez y col., 2000; Clemente y col., 2004) e inervan el músculo oblicuo superior del ojo contralateral mediante el cuarto nervio craneal o nervio troclear. Además, este núcleo recibe una importante entrada (proyección ascendente vestibular) vía fascículo longitudinal medial.

El núcleo de Edinger-Westphal (núcleo visceromotor) constituye una masa de grandes células que bordea el núcleo oculomotor dorsolateralmente y cuyos axones inervan el ganglio ciliar de la órbita que controla la musculatura intrínseca del ojo, implicada en la acomodación y reflejo pupilar (Nilsson, 1980; Wathey, 1988).

El núcleo del fascículo longitudinal medial está formado por neuronas de gran tamaño que proyectan a la médula espinal por medio del fascículo longitudinal medial, que también posee eferencias reticulares y vestibulares. Este núcleo se localiza en la región tegmental media, rostralmente al núcleo oculomotor.

En posiciones periventriculares del tegmento destacan las siguientes poblaciones neuronales: el núcleo mesencefálico del trigémino, el núcleo lateral de la válvula y el toro semicircular. El núcleo mesencefálico del trigémino se sitúa rostralmente en la superficie dorsolateral y está formado por grandes células que parecen estar

implicadas en funciones mecanorreceptivas (Luiten, 1979). El núcleo lateral de la válvula aparece en posición dorsomedial y consiste en pequeñas células, carentes de dendritas, que proyectan exclusivamente al cuerpo y a la válvula cerebelosos, y al toro longitudinal (Meek y col., 1986a; Ito y Yoshimoto, 1990).

El toro semicircular, homólogo del colículo inferior de mamíferos, es la estación terminal del lemnisco lateral y, por tanto, de las proyecciones octavolaterales secundarias. Se localiza en la región periventricular del tegmento mesencefálico. En teleósteos, es una eminencia o protrusión en el ventrículo mesencefálico bajo el techo óptico, cuyo tamaño y grado de diferenciación se correlaciona con el desarrollo de la región octavolateral rombencefálica y de los sistemas electrosensoriales. Así, aparece muy desarrollado en teleósteos electrorreceptivos (mormíridos y gimnótidos) pero no en salmónidos ni ciprínidos. En estos últimos, el toro semicircular puede subdividirse en una región o núcleo medial, implicada en el procesamiento principalmente de señales acústicas, y una región o núcleo lateral, implicada en el procesamiento de la información procedente de la línea lateral o información mecanorreceptora (Fay y col., 1982; Cuadrado, 1987, 1989).

En las porciones ventrales del tegmento mesencefálico, desde las regiones mediales hasta las laterales, se reconocen las siguientes agrupaciones: en núcleo interpeduncular (que recibe entradas de los núcleos habenulares, vía fascículo retroflexo), la formación reticular (continua con la formación reticular del rombencéfalo, cuyas neuronas y fibras presentan una disposición difusa) y el toro lateral, que aparece como una especie de cresta constituida por células difusas que protruyen en la superficie ventrolateral del tegmento; en especies de holósteos es de mayor tamaño, aunque también está presente en todas las especies de actinoptergios.

Rombencéfalo

Región del istmo

La región del istmo constituye la zona de transición entre el mesencéfalo y el rombencéfalo. Tradicionalmente ha sido considerada como parte del rombencéfalo (Nieuwenhuys y Pouwels, 1983), aunque algunos de sus núcleos tienen un origen mesencefálico (Vanegas e Ito, 1983; Bell y Szabo, 1986; Carr y Maler, 1986). A través de ella discurren diversos tractos de fibras, tanto ascendentes como

descendentes, incluyendo: el lemnisco lateral ascendente, el tracto gustatorio secundario, el fascículo longitudinal medial descendente y el tracto tectobulbar. En esta zona están presentes las siguientes agrupaciones celulares: el núcleo interpeduncular, el *locus coeruleus* y varios núcleos sensoriales secundarios como el núcleo gustatorio secundario, el núcleo pre-eminencial y el núcleo del istmo (estos dos últimos también han sido considerados como núcleos mesencefálicos).

El núcleo interpeduncular está situado en el suelo del tegmento ístmico y recibe proyecciones de la habénula por medio del fascículo retroflexo.

El *locus coeruleus* es una agrupación de neuronas de naturaleza aminérgica (Ekström y col., 1990; Batten y col., 1993) que se dispone lateroventralmente al cuarto ventrículo. Las entradas al *locus coeruleus* de teleósteos son comparables a las de la región subcoerular de mamíferos (Ekström y col., 1986).

El núcleo gustatorio secundario se localiza dorsolateralmente al ventrículo recibiendo aferencias de centros gustatorios primarios. Está constituido por neuronas multipolares de tamaño medio que presentan naturaleza colinérgica (Zottoli y col., 1988; Pérez y col., 2000; Clemente y col., 2004).

El núcleo pre-eminencial, rostroventral a las eminencias granulares, está muy desarrollado en teleósteos electrosensoriales. En estos está constituido por dos zonas: una grande y dorsal, implicada en la electrorrecepción, y otra pequeña y ventral, implicada en el procesamiento de información mecanosensorial de la línea lateral. Sin embargo, en teleósteos no electrosensoriales esta diferenciación no es tan patente.

El núcleo del istmo descansa rostralmente en la región del istmo, siendo considerado como un núcleo visual al presentar conexiones recíprocas con el techo óptico.

Cerebelo

El cerebelo deriva de la parte más rostródorsal del rombencéfalo (placa alar). Funcionalmente se relaciona con sistemas vestibulares, somatosensoriales, visuales y auditivos. En la mayoría de los teleósteos es una estructura de gran tamaño, compuesta básicamente por células granulares que originan fibras paralelas en la capa molecular, contactando con ramificaciones dendríticas de las células de

Purkinje. Atendiendo a su posición y morfología, el cerebelo puede dividirse en tres regiones (Nieuwenhuys y Pouwels, 1983): la válvula cerebelosa (región más anterior), el cuerpo cerebeloso (región media) y el lóbulo vestibulolateral (región más caudal).

La válvula cerebelosa es una protrusión rostral del cerebelo hacia el ventrículo mesencefálico, localizada rostralmente al cuerpo cerebeloso y bajo el techo óptico. Sólo está presente en peces actinopterigios y, en teleósteos, su forma y tamaño son variables. Histológicamente, la válvula cerebelosa, presenta tres capas: una capa granulosa más externa (o capa de las células grano), una capa ganglionar (que contiene células de Purkinje y células denominadas euridendroides) y una capa molecular más profunda. La mayoría de las células granulares se localiza lateralmente a la capa molecular, originando fibras paralelas sin ramificaciones (con forma de T), mientras que las células de Purkinje se disponen sobre la capa molecular. Las principales entradas a la válvula cerebelosa se originan en el núcleo lateral de la válvula, aunque también recibe aferencias del pretecho (núcleo central), tegmento mesencefálico (núcleos dorsal y ventral), núcleo óptico accesorio dorsal y núcleo del istmo.

El cuerpo cerebeloso constituye la región central del cerebelo, siendo la que mayor volumen ocupa de éste y situándose entre la válvula cerebelosa y el lóbulo vestibulolateral. En la mayoría de los teleósteos se extiende caudalmente como una protrusión sobre el cuarto ventrículo, formando un lóbulo tubular cuya morfología es variable. Histológicamente presenta las mismas capas que las comentadas para la válvula cerebelosa pero con una distribución invertida. Entre las aferencias, cabe destacar las entradas procedentes de varios núcleos telencefálicos, mesencefálicos y ópticos accesorios. El cuerpo cerebeloso proyecta al pretecho, techo óptico, tálamo, formación reticular mesencefálica y lóbulos inferiores hipotalámicos. En lo que se refiere a su funcionalidad, el cuerpo cerebeloso parece relacionarse con el control motor (movimientos locomotores).

El lóbulo (región) vestibulolateral es la parte más caudal del cerebelo y constituye una estructura sólida implicada en el procesamiento de la información sensorial procedente de la línea lateral, debido a sus conexiones aferentes y eferentes con la región octavolateral del rombencéfalo (Murakami y Morita, 1987). Su organización

varía de unos teleósteos a otros, pudiendo subdividirse en dos partes: el lóbulo caudal y las eminencias granulares. Las eminencias granulares están constituidas por masas de células grano de las que parten una capa de fibras que discurre en la región de la línea lateral del rombencéfalo denominada cresta cerebelosa.

Bulbo raquídeo

El bulbo raquídeo, también denominado mielencéfalo o *medulla oblongata*, limita rostralmente con el mesencéfalo y caudalmente con la médula espinal. En su interior se aloja el cuarto ventrículo. Su porción anterior está cubierta parcialmente por el cerebelo y posteriormente por la tela coroidea. El bulbo raquídeo puede subdividirse en dos placas, la placa alar y la placa basal, que están separadas por el surco limitante de His. La placa alar, debido a su posición dorsolateral, constituye las paredes dorsales del bulbo y a ella llegan las principales aferencias sensoriales, por ello se denomina zona sensorial. La placa basal o zona motora contiene los núcleos motores o eferentes, y se sitúa en posiciones ventromediales constituyendo las paredes ventrales del bulbo. A su vez, ambas placas pueden ser subdivididas en zonas viscerales y somáticas, según el tipo de información que procesen, por lo que aparecerán un área somatosensorial (dorsomedial), un área viscerosensorial (dorsolateral), un área somatomotora (ventromedial) y un área visceromotora (ventrolateral).

La zona somatosensorial está prácticamente ocupada por centros relacionados con fibras nerviosas de los nervios vestibular-coclear (VIII), trigémino (V) y de la línea lateral (anterior y posterior). Dichos centros pueden subdividirse en generales y especiales. El sistema somatosensorial general está formado por los núcleos del trigémino (núcleo sensitivo del trigémino, núcleo del tracto descendente del trigémino y núcleo funicular medial), implicados en el procesamiento de la información propia de este sistema (temperatura, tacto y dolor de la región de la cabeza). En teleósteos adultos, esta región está migrada desde la superficie ventricular y se localiza lateroventralmente a los núcleos somatosensoriales especiales, conectados con receptores acústicos, vestibulares, mecanosensoriales de la línea lateral y electrosensoriales, mediante aferencias primarias que constituyen el nervio VIII y los nervios de la línea lateral anterior y posterior. Denominada área octavolateral por Nieuwenhuys y Pouwels (1983), la zona somatosensorial especial

de teleósteos consiste en una zona localizada ventralmente (que protruye en la región intermediodorsal) y en una zona localizada lateralmente (cubierta por parte de la cresta cerebelosa) en teleósteos. En la región ventral (octava) se disponen, en sentido rostrocaudal, los siguientes núcleos: anterior, magnocelular, tangencial, descendente y posterior. En los teleósteos electrorreceptivos, en la región lateral del área octavolateral, se distinguen: el núcleo medial, que procesa la información mecanorreceptiva de la línea lateral, y el núcleo lateral, relacionado con el procesamiento de la información electrorreceptiva.

La zona viscerosensorial está localizada en posición laterodorsal al surco limitante de His (Nieuwenhuys y Pouwels, 1983) y representa la región terminal de los componentes viscerosensoriales de los nervios facial (VII), glossofaríngeo (IX) y vago (X). Al igual que en la zona somatosensorial, se pueden diferenciar núcleos viscerosensoriales generales y núcleos viscerosensoriales especiales. Las fibras aferentes viscerales generales llevan información de los receptores situados en los órganos viscerales y en los vasos sanguíneos (quimiorrepción general e interocepción táctil), mientras que las fibras aferentes especiales se relacionan con la percepción del gusto. En varias especies de teleósteos, mediante la aplicación de trazadores (Morita y Finger, 1987a, b), se han identificado algunos de los núcleos que reciben información viscerosensorial general en posiciones caudales del bulbo raquídeo, concretamente el núcleo comisural de Cajal y el área postrema. En ciprínidos, el núcleo comisural de Cajal puede subdividirse en una porción medial y en una porción lateral; de éstas, sólo la primera recibe entradas interoceptivas procedentes de la raíz del nervio vago, mientras que la porción lateral está conectada con el órgano masticador (Sibbing, 1984; Morita y Finger, 1987b). El área postrema está implicada en funciones quimiorreceptivas y se considera la parte más caudal de la zona viscerosensorial rombencefálica. Las aferencias viscerales primarias especiales (ascendentes y descendentes) en la mayoría de los teleósteos forman un haz, el denominado fascículo solitario, que termina en el núcleo del fascículo solitario (Nieuwenhuys y Pouwels, 1983). Aquellos teleósteos que poseen un sentido del gusto muy desarrollado, como ictalúridos y ciprínidos, presentan una gran diferenciación y especialización de estos centros, formando los lóbulos del facial, glossofaríngeo y vago (Finger, 1983a, b, 1988). El lóbulo facial es un alargamiento de la parte rostral del tracto solitario y recibe entradas sensoriales del nervio facial, el

cual se conecta con los receptores del gusto de la parte anterior de la boca, de los labios y de toda la superficie corporal. El lóbulo vagal es la subdivisión caudal del núcleo del tracto solitario y se trata de una estructura par, altamente laminada y topográficamente organizada, cubriendo gran parte de la superficie dorsal del rombencéfalo.

La zona somatomotora se considera como la continuación rostral del asta anterior de la médula espinal, y contiene el núcleo motor del nervio abducente (VI), situado ventralmente a nivel de la entrada del nervio VIII, las células de Mauthner y los núcleos vestibulares. En algunos teleósteos consiste en dos partes separadas, una rostral y otra caudal (Cabrera y col., 1991; Pastor y col., 1991), que inervan el músculo extraocular lateral o posterior. La región somatomotora se extiende por el mesencéfalo donde se localizan los núcleos del nervio oculomotor común (III) y del troclear (IV). Las fibras de los núcleos somatomotores III, IV y VI inervan los músculos externos del ojo. Además, en esta región también se encuentran el núcleo eferente octavolateral, la agrupación del rafe, la formación reticular y diversos tractos de fibras (fascículo longitudinal medial, tracto vestibuloespinal y tracto tectobulbar).

El núcleo eferente octavolateral se localiza dorsal y lateralmente a la parte ventral del fascículo longitudinal medial, a nivel del núcleo motor del facial

El rafe se sitúa en la línea media del mesencéfalo y del rombencéfalo, y se caracteriza por presentar células serotoninérgicas (Ekström y Van-Veen, 1984; Ekström y Ebbesson, 1989; Meek y col., 1989; Johnston y col., 1990). En varios teleósteos, así como en el múgil, se han diferenciado un núcleo del rafe mesencefálico, rostral o superior, y un núcleo del rafe rombencefálico, caudal o posterior; aunque, en general, las neuronas del rafe presentan gruesas prolongaciones orientadas radialmente que penetran en la formación reticular.

La formación reticular es una región poco diferenciada que está constituida por grandes células multipolares o reticulares cuyas dendritas se orientan en todas las direcciones, estableciendo un retículo con variedad de sistemas ascendentes y descendentes. Estas células parecen jugar un papel importante en la coordinación de la actividad motora. La formación reticular puede dividirse en tres regiones longitudinales: la región media (en las proximidades del rafe), la región medial (la de

mayor tamaño) y la región lateral (la de menor tamaño). Las regiones media y medial se continúan en el mesencéfalo, mientras que la región lateral está restringida al rombencéfalo. En la región medial hay neuronas de tamaño medio y grande. También en la formación reticular medial se han descrito un par de células, las células de Mauthner, consideradas como las más grandes de esta formación. Se sitúan una a cada lado de la línea media a nivel de la entrada del nervio VIII; cada una de ellas posee una gran dendrita lateral y un axón que desciende contralateralmente en la médula espinal. Funcionalmente parecen intervenir en la iniciación del reflejo de escape.

El fascículo longitudinal medial es un tracto compacto de fibras, localizado en la parte dorsomedial de la zona ventral rombencefálica y mesencefálica, que conecta diversos centros del tallo cerebral (núcleo vestibular y formación reticular) con el aparato somatomotor de la médula espinal y la oliva inferior.

El tracto vestibuloespinal es un haz separado de fibras vestibuloespinales, que se localiza ventrolateralmente al fascículo longitudinal medial en la formación reticular.

La zona visceromotora o braquiomotora contiene los núcleos de los nervios trigémino (V), facial (VII), glossofaríngeo (IX) y vago (X). Los núcleos visceromotores forman una columna continua, excepto a nivel de los nervios trigémino y facial, donde parece existir una amplia separación (Nieuwenhuys y Pouwels, 1983). Estas neuronas inervan la musculatura branquial y la de las vísceras abdominales (músculo liso de órganos internos, músculo cardíaco y glándulas), estando implicadas en acciones vitales tales como la captura de presas, la alimentación y la respiración.

El núcleo motor del trigémino es el más rostral e inerva los músculos de la boca, interviniendo en la generación de los movimientos respiratorios. El núcleo motor del facial, localizado caudalmente a la entrada del nervio VIII y las células de Mauthner (Nieuwenhuys y Pouwels, 1983), inerva los músculos del opérculo y participa, al igual que el anterior, en los movimientos respiratorios. El nervio glossofaríngeo inerva el tercer arco branquial. El núcleo motor vagal puede subdividirse en una parte visceromotora general, localizada caudomedialmente y comparable al núcleo vagal dorsal de amniotas, y una parte visceromotora especial o braquiomotora,

localizada más rostralmente y comparable al núcleo ambiguo de amniotas (Morita y Finger, 1987b; Díaz Regueira y Anadón, 1992).

Médula espinal

La médula espinal es un tubo cilíndrico o ligeramente aplanado que se extiende longitudinalmente desde el rombencéfalo hasta la aleta caudal. En su interior presenta una pequeña cavidad central denominada canal central (medular o neural), en donde se observan neuronas líquido cefalorraquídeo-contactantes, cuyas gruesas dendritas penetran en el canal central, donde contactan con otras neuronas líquido cefalorraquídeo-contactantes y la fibra de Reissner, mientras que sus delgados procesos axónicos se extienden radialmente y cursan rostral o caudalmente. Rodeando al canal central se encuentra la sustancia gris, constituida por cuerpos neuronales, y externamente a ésta se sitúa la sustancia blanca, compuesta por fibras nerviosas. Esta disposición de las sustancias blanca y gris no es la misma en todas las especies de peces, pudiendo estar claramente separadas o entremezcladas.

Las neuronas de la sustancia gris adoptan una posición ventrolateral y dorsolateral al canal neural, constituyendo, respectivamente, las astas ventral (anterior) y dorsal (posterior) de la médula espinal. De la médula parten dos series de raíces, una anterior y otra posterior, que acaban fusionándose para originar los nervios espinales mixtos que, junto con los nervios craneales, constituyen el sistema nervioso periférico. El asta dorsal de teleósteos puede considerarse como una sustancia gelatinosa (Nieuwenhuys, 1964), en la que los terminales axónicos de las células ganglionares espinales contactan con las neuronas fusiformes y granulares del asta dorsal y con las dendritas de motoneuronas e interneuronas localizadas más ventralmente. Las motoneuronas se localizan en el asta ventral y son grandes células multipolares con extensas dendritas que se introducen en el asta dorsal y en la sustancia blanca. Las motoneuronas presentan naturaleza colinérgica (Tsuji, 1975; Sandri y col., 1976; Brantley y Bass, 1988; Pérez y col., 2000; Clemente y col., 2004) y, en teleósteos, pueden distinguirse motoneuronas primarias y secundarias. Las primarias, de mayor tamaño, ocupan una posición dorsomedial e inervan la musculatura rápida del tronco; las secundarias, más pequeñas, se localizan ventralmente e inervan la musculatura lenta del tronco y las aletas.

La sustancia blanca de la médula espinal presenta un surco anterior y un tabique posterior. Debido a estas formaciones, y a las astas de la sustancia gris, la sustancia blanca queda dividida en funículos o cordones que, según su posición son: el funículo ventral (o anterior), el funículo lateral y el funículo dorsal (o posterior). En el funículo ventral se sitúa el fascículo longitudinal medial.

En la región del óbex, zona de transición entre el rombencéfalo y la médula espinal, se incluyen el núcleo funicular y el núcleo comisural de Cajal (anteriormente descritos en el bulbo raquídeo).

Las fibras aferentes encefálicas alcanzan la médula espinal a través del tracto bulboespinal, tracto vestibuloespinal y fascículo longitudinal medial.

La médula espinal actúa como estación intermediaria o de relevo entre los centros superiores del sistema nervioso y distintos órganos del cuerpo, transfiriendo impulsos en ambas direcciones. Asimismo es el centro donde se originan los actos reflejos de la natación y de reacción ante situaciones de peligro.

LA CARNOSINA (β -ALANIL-L-HISTIDINA)

La carnosina (β -alanil-L-histidina) y otros dipéptidos relacionados con la amino-acil-histidina, tales como la homocarnosina (γ -aminobutiril-L-histidina) y la anserina (β -alanil-N-metil-L-histidina), están presentes en el músculo y tejido nervioso de muchos vertebrados (Margolis, 1980).

La carnosina fue identificada a principios del siglo XX (Gulevitsch y Amiradzibi, 1900; Gulevitsch, 1911), convirtiéndose en el primero y más simple ejemplo de péptido biológicamente activo, abriendo así una larga lista de proteínas reguladoras del metabolismo, que están ampliamente distribuidas en la naturaleza.

Tras las primeras décadas posteriores a su descubrimiento, donde las investigaciones se centraron en el estudio de su estructura (Figs. 4, 5), distribución y propiedades del compuesto, Gulevitsch (1926) postuló que la carnosina estaba directamente implicada en el funcionamiento de tejidos excitables, ya que esta sustancia se había encontrado en los tejidos musculares.

Tras su descubrimiento, se lograron identificar y caracterizar en el músculo otros

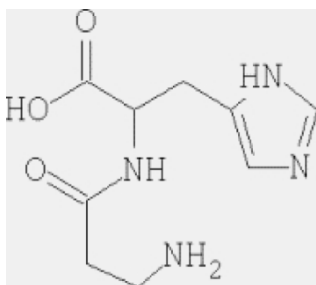


Fig. 4. Estructura química de la carnosina

dipéptidos relacionados con la carnosina, tales como la anserina (Ackermann y col., 1929, Tolkatshevskaya, 1929) o la homocarnosina (Pisano y col., 1961). Posteriormente, se llevaron a cabo numerosos estudios bioquímicos en diversos vertebrados, incluyendo la especie humana, demostrando que estas sustancias estaban también presentes en el sistema nervioso central y en

varios sistemas sensoriales, tales como el sistema olfatorio y el sistema visual (Margolis y Grillo, 1984).

En las últimas décadas, la disponibilidad de antisueros específicos ha permitido una más detallada investigación de la distribución y localización celular de estos dipéptidos. Se han producido y desarrollado dos antisueros policlonales de conejo contra la carnosina (Sakai y col., 1987; Biffo y col., 1990) y uno contra la anserina (Biffo y col., 1990), utilizados en numerosos estudios inmunohistoquímicos. El suero anti-anserina purificado es monoespecífico y no presenta reacciones cruzadas con otros dipéptidos relacionados; mientras que los sueros anti-carnosina purificados sí pueden tener reacciones cruzadas con la carnosina, homocarnosina y anserina (Sakai y col., 1987; Biffo y col., 1990).

Los estudios de localización de la carnosina y sus dipéptidos relacionados muestran un complejo modelo de expresión que implica tanto neuronas como diferentes tipos de células gliales. La localización glial está ampliamente distribuida a lo largo de todo el encéfalo y médula espinal, e incluye tanto astrocitos como oligodendrocitos maduros, mientras que la localización neuronal está restringida a un tipo particular de neuronas que son las neuronas receptoras olfativas, y a poblaciones concretas de supuestas neuronas migratorias y neuroblastos. Aunque no hay una demostración definitiva de su función en estas células, la carnosina y los dipéptidos relacionados podrían estar implicados en un mecanismo funcional neuromodulador en células gliales funcionales maduras (Margolis, 1980).

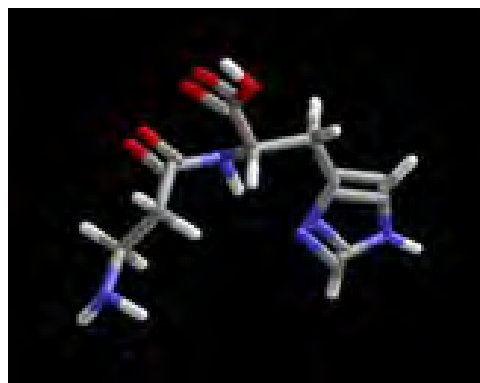


Fig. 5. Estructura molecular de la carnosina

Distribución de la carnosina y dipéptidos relacionados en el sistema nervioso de vertebrados

La aparición y distribución de diferentes dipéptidos relacionados con la carnosina presentan un alto grado de variabilidad entre los distintos grupos de vertebrados.

Vertebrados inferiores

Los análisis bioquímicos llevados a cabo en el sistema nervioso de vertebrados inferiores (anfibios y reptiles) demostraron que el péptido presente mayoritariamente es la homocarnosina y, en menor medida, la carnosina (Margolis y Grillo, 1984; Artero y col., 1991a, b).

Estudios inmunocitoquímicos han demostrado que en el cerebro de anfibios anuros y reptiles, estos dipéptidos se localizan en células gliales, mientras que en anfibios urodelos su presencia está restringida a neuronas de varias zonas del cerebro (Artero y col., 1991a, b). En reptiles, estos dipéptidos se han encontrado en el sistema olfatorio, asociados a las neuronas olfatorias, mientras que en anfibios no se detectó su presencia en esta población neuronal (Margolis, 1980; Artero y col., 1991a). Sin embargo, utilizando un anticuerpo monoclonal contra la carnosina sintetasa (enzima responsable de la síntesis de carnosina) de mamíferos, se ha detectado inmunorreactividad en una población de neuronas receptoras olfatorias de la rana (Crowe y Pixley, 1991). Curiosamente, éste es el único caso en el que puede ser detectada inmunorreactividad para la carnosina sintetasa con este anticuerpo (De Marchis y col., 2000).

En la retina de anfibios, donde se detectó carnosina por primera vez (Margolis y Grillo, 1984), la inmunorreactividad fue localizada en los fotorreceptores y células bipolares. Sólo unas pocas células amacrinas y ganglionares, así como los pies subpiales de las células de Müller fueron inmunopositivos (Sassoe-Pogneto y col., 1992; Panzanelli y col., 1997). Otros receptores sensoriales contienen dipéptidos relacionados con la carnosina en diferentes especies: las células ciliadas de los canales semicirculares del oído interno de la rana (Panzanelli y col., 1994) y las células sensoriales del órgano de la línea lateral de *Xenopus* (Mroz y Sewell, 1989). Además, se han detectado niveles significativos de estos dipéptidos en el nervio sacular de la trucha (Drescher y Drescher, 1991).

En el cerebro de lagartos (*Gallotia galloti* y *Tarentola delalandii*) y anfibios anuros (*Xenopus laevis* y *Rana esculenta*) (Artero y col., 1991a) se encontró inmunopositividad a la carnosina en prolongaciones gliales, tanto en la sustancia blanca como en la sustancia gris. Estas prolongaciones alcanzan la superficie cerebral, donde terminan en pies subpiales. La inmunorreactividad a la carnosina también se encontró en las células endoteliales y en elementos gliales de pequeño tamaño, en su mayoría de aspecto astrocítico, en todas las regiones cerebrales. Estos elementos celulares fueron mucho más numerosos en las especies de reptiles (especialmente en el diencefalo, mesencefalo y rombencefalo) que en los anfibios anuros. La distribución de elementos inmunorreactivos a la carnosina coincide con la distribución de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), un marcador clásico de la astroglia (Artero y col., 1991a). Sin embargo, en anfibios urodelos (*Triturus cristatus*) la inmunorreactividad a la carnosina sólo se aprecia en neuronas (Artero y col., 1991b).

El modelo de inmunorreactividad a la carnosina en el sistema olfatorio de reptiles es claramente diferente a los modelos encontrados en anfibios. En el bulbo olfatorio de anfibios se encontró inmunopositividad a la carnosina sólo en elementos gliales, sin inmunorreactividad en las neuronas olfatorias. Por el contrario, en *Gallotia galloti* y *Tarentola delalandii*, el marcaje fue observado en neuronas olfatorias quimiosensoriales del neuroepitelio, en las fibras que forman el nervio olfatorio, en el glomérulo olfatorio del bulbo y en los glomérulos de los bulbos olfatorios accesorios (Artero y col., 1991a).

Análisis electroforéticos han permitido demostrar la presencia tanto de carnosina como de homocarnosina en el sistema nervioso central de diferentes especies de anfibios (*Rana esculenta* y *Xenopus laevis*) y reptiles (*Gallotia galloti* y *Tarentola delalandii*). Estas observaciones coinciden con los datos encontrados en el sistema nervioso central de *Rana* y *Gecko* (Margolis, 1980; Margolis y Grillo, 1984).

Aves

Estudios bioquímicos han demostrado la presencia de carnosina y anserina en el cerebro de pollos y patos (Fisher y col., 1977). Posteriormente se determinaría que la anserina se encontraba asociada a células gliales, mientras que la carnosina sólo

aparecía en neuronas receptoras olfatorias del neuroepitelio olfatorio, así como en los glomérulos del bulbo olfatorio (Biffo y col., 1990). Además se han encontrado elevados niveles de anserina en la retina de aves (Margolis y Grillo, 1984). Coincidiendo con los datos obtenidos en estos estudios químicos, los análisis inmunohistoquímicos de la retina de pollo demuestran que la anserina se encuentra mayoritariamente en una población glial de la retina: las células de Müller (De Marchis y col., 2000).

Mamíferos

Los numerosos estudios realizados sobre la distribución y localización celular de la carnosina y homocarnosina en el sistema nervioso de mamíferos han mostrado un modelo complejo de distribución, involucrando a diferentes tipos celulares. La síntesis de ambos dipéptidos es catalizada por un único complejo enzimático, la carnosina sintetasa (Skaper y col., 1973; Horinishi y col., 1978), que está presente tanto en neuronas (Harding y Margolis, 1976; Ng y col., 1977; Burd y col., 1982) como en células de la glía (Bauer y col., 1979, 1982; Hoffmann y col., 1996; Bauer, 2005). Sin embargo, entre estos dos tipos celulares hay grandes diferencias tanto en la distribución regional de las células que contienen carnosina y/o homocarnosina como en la mayor o menor abundancia de estos dipéptidos. Por el contrario, mediante métodos analíticos se ha comprobado la ausencia de anserina en el sistema nervioso central de mamíferos (Wideman y col., 1978; Margolis, 1980; Biffo y col., 1990).

Los primeros estudios llevados a cabo en el sistema nervioso de mamíferos adultos, demuestran que la carnosina se localiza principalmente en una población de células situadas fuera del cerebro: las neuronas receptoras olfativas (ORN_s). Investigaciones posteriores mostraron que estos dipéptidos estaban también presentes en supuestas poblaciones de neuronas y neuroblastos con características de células migratorias. En la actualidad y durante el desarrollo fetal y postnatal, se ha observado la presencia de estos dipéptidos en células que migran desde la región nasal hacia el cerebro y en neuroblastos que migran del estrato subependimario (De Marchis y col., 2000).

Desde las primeras etapas del desarrollo postnatal, se observa una intensa inmunorreactividad a la carnosina en fibras y grupos aislados de células localizados

principalmente en el hipotálamo anterior, núcleos del tálamo, núcleo paraventricular, núcleo supraquiasmático, órgano subfornical y capa externa de la eminencia media (De Marchis y col., 2000). Si bien no hay una evidencia constatable de que las células inmunorreactivas para la carnosina en estas zonas sean neuronas, la distribución tanto de fibras como de células inmunorreactivas es muy similar a la descrita para las bien caracterizadas neuronas migratorias que expresan GnRH (Merchenthaler y col., 1984).

A diferencia de la restringida localización de la carnosina en células de carácter neuronal, la presencia de la carnosina en células gliales está ampliamente distribuida tanto en el cerebro como en la médula espinal, incluyendo células endimarias y tanicitos (Bonfanti y col., 1999), además de los astrocitos que forman los tubos gliales de la capa subependimaria (Peretto y col., 1999). Tanto las células endimarias como el estrato subependimario se consideran el compartimento de células madre en el sistema nervioso central adulto (Altman, 1969; Johansson y col., 1999).

Mediante la preparación de cultivos selectivos enriquecidos de oligodendrocitos y astrocitos se ha demostrado que las células gliales pueden sintetizar estos dipéptidos (Bauer y col., 1979), restringiendo la síntesis a los oligodendrocitos y la captación, pero no la síntesis, a los astrocitos (Hoffmann y col., 1996).

En la especie humana los datos preliminares sobre la localización inmunohistoquímica de carnosina y dipéptidos relacionados en el cerebro revelan la presencia de estas sustancias en células de aspecto glial de la sustancia blanca subcortical. Basándose en su aspecto morfológico estas células inmunopositivas podrían ser oligodendrocitos (De Marchis y col., 2000). Por el contrario, otros estudios previos que describen la localización de homocarnosina en humanos apuntan a que su presencia está restringida a somas neuronales y fibras nerviosas (Jackson y col., 1994; Jackson y Lenney, 1996). Los resultados inmunohistoquímicos en tejidos humanos son, a menudo, difíciles de interpretar debido a la deficiente conservación del tejido y de ahí, es posible que aparezcan falsos positivos (De Marchis y col., 2000).

Funciones de la carnosina

Los estudios realizados sobre las posibles funciones de la carnosina y dipéptidos relacionados han demostrado que estas sustancias son capaces de actuar en diferentes pero correlativas rutas como agentes protectores (antioxidantes, quelantes metálicos, "limpiadores" y/o recogedores de radicales libres e inhibidores de la glicosilación proteica) (De Marchis y col., 2000).

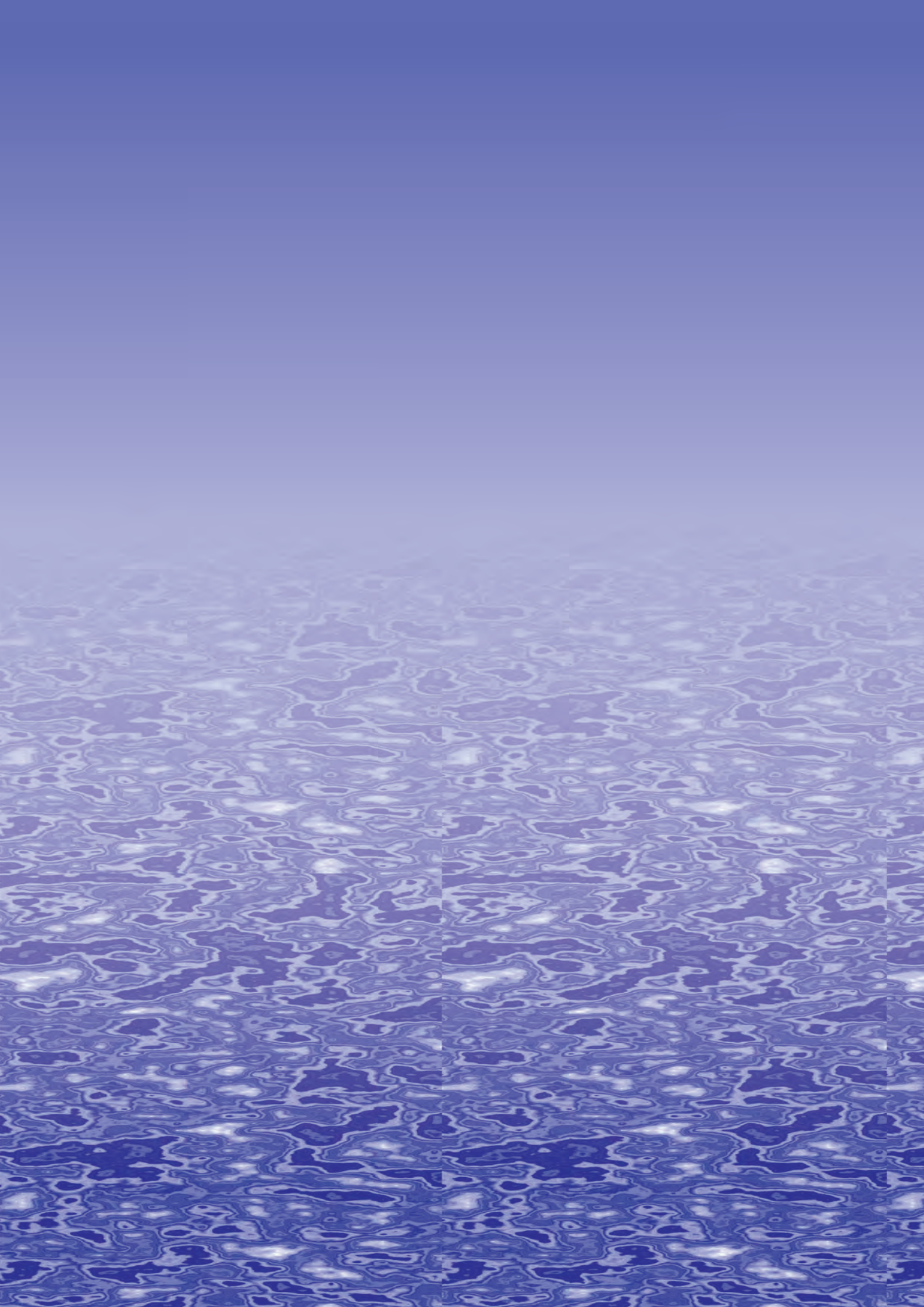
La carnosina parece tener un efecto beneficioso en el crecimiento, morfología y longevidad de fibroblastos humanos en cultivo (McFarland y Holliday, 1999) y se ha demostrado *in vitro* que la carnosina protege a las células granales del cerebelo de rata del daño provocado por los radicales libres (Boldyrev y col., 1999). Las propiedades antioxidantes y/o anti-inflamatorias de la carnosina, hacen que haya sido propuesta para reducir o aminorar el daño pulmonar causado por radioterapia administrándola como suplemento (Guney y col. 2006). También se sugiere que actúa como una sustancia anticonvulsionante endógena en el cerebro y por ello podría considerarse de gran utilidad en el desarrollo de tratamientos para la epilepsia en el futuro (Kozan y col., 2008).

Además en pacientes con Alzheimer, se observó que los niveles de carnosina e histidina en plasma sufrían un descenso respecto a pacientes normales, lo que era indicativo de que estos sujetos no podían controlar fácilmente procesos peroxidativos. Esto, unido al descenso de la capacidad de prevenir la oxidación, da como resultado un aumento de células nerviosas en degeneración, provocando un descenso de la función mental y cognitiva. Estudios basados en la suplementación en la dieta con carnosina e/o inhibidores de la biosíntesis de dopamina, dieron como resultado la recuperación de los niveles de concentración de esta molécula (carnosina) ayudando a prevenir la progresión de la enfermedad y/o aminorar sus síntomas (Fonteh y col., 2006).

The background of the slide is a photograph of a blue sky above a body of water. The water's surface is covered in ripples, and a reflection of a person is visible on the left side. The text is overlaid on the right side of the image.

Justificación y objetivos

Justificación y objetivos



En general, todas las investigaciones dedicadas al estudio del sistema nervioso inciden, de modo más o menos indirecto, en la comprensión del funcionamiento del cerebro humano, debido fundamentalmente a la organización común que comparte este sistema en las distintas especies de vertebrados.

Por otra parte, los peces, y dentro de éstos los teleósteos, representan el grupo más numeroso y, además, la organización de su sistema nervioso es homóloga a la de otros vertebrados. El pequeño tamaño de su encéfalo convierte a los teleósteos en un excelente modelo biológico para el estudio del sistema nervioso.

En el sistema nervioso de vertebrados existe una notable diversidad de neuronas en función de los neurotransmisores y otras sustancias neuroactivas fabricadas y liberadas por ellas. Algunos neurotransmisores, bien de efecto excitador o inhibidor, tienen una distribución amplia en poblaciones neuronales, y las neuronas que los utilizan constituyen la base de los principales circuitos neuronales.

Se conoce la presencia de carnosina en el sistema nervioso de algunos mamíferos, anfibios y reptiles pero, hasta el momento de la realización de este estudio, no existía ningún estudio que abordara la localización y distribución detallada de este dipéptido en el sistema nervioso de ningún grupo de peces.

Por todo ello, los objetivos que se plantearon al inicio de la realización de este estudio fueron los siguientes:

- 1) Identificar y caracterizar las principales poblaciones inmunorreactivas a la carnosina en el encéfalo del mágil adulto.
- 2) Estudiar la organización de los sistemas inmunopositivos a la carnosina.
- 3) Comparar la distribución de estructuras de naturaleza neuronal y/o glial inmunopositivas a la carnosina con los resultados obtenidos en otras especies de vertebrados.



Material y métodos

Material y métodos



Obtención y procesamiento del material biológico

Para la realización de este estudio se han requerido 50 ejemplares adultos de mágil (*Chelon labrosus* Risso, 1826) capturados en la ría de A Coruña (España), con una longitud comprendida entre 10 y 45 cm.

Una vez en el laboratorio, los especímenes fueron profundamente anestesiados por inmersión en metanosulfonato de tricaína (MS-222, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluido al 0,05% en agua de mar y fijados transcardialmente con paraformaldehído al 4% (Merck) en tampón fosfato (TF) 0,1 M pH 7,4. Seguidamente, las cabezas de los ejemplares utilizados se postfijaron por inmersión durante 24 horas (en el mismo fijador) para a continuación extraer los cerebros.

Tras su fijación, los encéfalos fueron lavados en TF y crioprotegidos en disoluciones crecientes de sacarosa (10, 20 y 30%) en TF a 4°C durante 4, 8 y 12 h, respectivamente. Posteriormente se embebieron en un medio de inclusión específico para criostato (Tissue-Tek OCT Compound: Sakura Finetek Europe, Zuid- Holland, Netherlands) y congelaron en 2-metilbutano (Sigma-Aldrich) enfriado en nitrógeno líquido. Los cerebros fueron cortados transversalmente con un criostato HM500-M de la casa Microm, a 20°C bajo cero, y las secciones, de 10-14 µm de grosor, recogidas en portaobjetos gelatinizados. En la mayoría de los casos se realizaron series paralelas.

Durante la totalidad del proceso de experimentación, los animales fueron manipulados conforme a la normativa vigente relativa al uso de animales en experimentación y otros fines científicos (Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, BOE núm. 34 de 8 de febrero de 2013).

Inmunohistoquímica

Para la detección inmunohistoquímica de la carnosina (y dipéptidos relacionados) en secciones de cerebro de mágil se recurrió tanto al método basado en el complejo estreptavidina-biotina (Hsu y Raine, 1981) como a la (doble) inmunofluorescencia indirecta (Weller y Coons, 1954).

Como anticuerpo primario, se ha empleado un anticuerpo policlonal desarrollado en conejo, cedido por el Dr. F. L. Margolis (Departamento de Anatomía y

Neurobiología, Universidad de Maryland, Baltimore, USA). A fin de incrementar la especificidad de la reacción, el anticuerpo primario, anti-carnosina, fue preadsorbido con conjugados BSA-Glicina y BSA-histidina.

Detección inmunohistoquímica de la carnosina mediante el método del “ABComplex”

Previamente al desarrollo del método inmunohistoquímico, los cortes fueron liberados del soporte en el cual se incluyeron, sometiéndoseles a tres baños de tampón fosfato salino (TFS) 0,1 M pH 7,4, de 10 min de duración cada uno.

Las secciones, libres del medio de inclusión, se trataron con peróxido de hidrógeno (Merck) al 5% en TFS durante 30 minutos, para de esta manera bloquear toda actividad peroxidasa endógena.

Tras realizar 2 lavados con TFS (de 10 min de duración cada uno), las secciones se trataron con suero normal de cabra (Dakopatts, Glostrup, Dinamarca; X0907) diluido 1/10 en TFS, durante 60 minutos a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Así, se reduce la tinción de fondo, al bloquear el suero normal cualquier tipo de antígeno presente en la sección que pueda reaccionar con el antisuero a emplear.

A continuación, las secciones se incubaron con el antisuero primario, anti-carnosina, diluido 1/400 en TFS, al cual se añadió un 0,3% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich), durante 15-20 horas y en las mismas condiciones que las señaladas para la incubación con el suero normal.

Después de llevar a cabo 2 lavados con TFS (de 12 min de duración cada uno), las secciones se trataron con inmunoglobulinas de cabra anti conejo marcadas con biotina (Dako, E0432) diluidas 1/500 en TFS.

Al cabo de 30 min, las secciones se lavaron, durante 10 min, con TFS y después con tampón tris clorhídrico (Tris-HCl) 0,05 M pH 7,6 durante un tiempo similar, para a continuación tratar las secciones con el complejo preformado de la streptavidina con la peroxidasa de rábano biotinilada (Dako; K0355) durante 60 min a temperatura ambiente y en cámara húmeda.

Tras realizar 3 lavados con Tris-HCl (de 10 min de duración cada uno), la reacción histoquímica (actividad peroxidasa) fue revelada usando 3,3'-tetrahidrocloruro de diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich) al 0,06% y peróxido de hidrógeno al 0,005% en Tris-HCl. La reacción se mantuvo de 10 a 15 minutos, deteniéndose con tampón Tris-HCl.

Finalmente, las secciones, una vez deshidratadas mediante el paso de las mismas por etanoles de gradación creciente (80°, 96° y 100°), fueron aclaradas en xileno y montadas con Eukitt (Agar Scientific, Stansted Essex, UK; AGR1339).

Doble inmunofluorescencia para carnosina y HuC/D

Para caracterizar la naturaleza neuronal de las células que expresan carnosina, algunas series de secciones de cerebro de mágil fueron procesadas mediante doble inmunofluorescencia, empleando además un anticuerpo monoclonal desarrollado en ratón que reconoce específicamente el antígeno neuronal HuC/D de origen humano (Invitrogen-Molecular Probes, Eugene, Oregón, USA; A21271).

Así, las secciones libres del medio de inclusión se trataron con borohidruro de sodio (Panreac) 0,1 M en TFS durante 30 minutos. Tras ser incubadas con suero normal de cabra (Dakoppats) diluido 1/10 en TFS durante 1 hora, las secciones se trataron con la siguiente combinación de antisueros primarios: anti-carnosina (dilución 1/400) y anti-HuC/D (diluido 1/500) en TFS, al cual se añadió un 0,3% de Tritón X-100 (Sigma-Aldrich), durante 20 h. Tras varios lavados en TFS, las secciones se trataron con una mezcla de inmunoglobulinas de cabra anti ratón acopladas a fluoresceína (Sigma-Aldrich; F0257) y de cabra anti conejo acopladas a Texas-Red (Sigma-Aldrich; SAB3700974) diluidas 1/50 en TFS durante 2 horas (y en oscuridad). Después de varios lavados en TFS, las secciones fueron montadas con Vectashield (Vector, Burlingame, CA). Todos los experimentos fueron llevados a cabo a temperatura ambiente.

Controles y especificidad de las pruebas realizadas

El anticuerpo contra la carnosina empleado dio modelos reproducibles de inmunomarcaje en todos los especímenes estudiados. Los controles inmunohistoquímicos para la carnosina incluyeron: 1) omisión del antisuero

primario, siendo sustituido por suero no inmune y desarrollo normal de la prueba inmunohistoquímica (control negativo), y 2) incubación de las secciones en suero contra la carnosina, preincubado con el conjugado carnosina-BSA. En ningún caso se observó marcaje alguno en el tejido.

Por otro lado, el anticuerpo monoclonal utilizado contra el marcador neuronal general HuC/D ha sido probado en varias especies de peces teleósteos (pez cebra: Bernardos y Raymond, 2006; Grandel y col., 2006; Tapanes-Castillo y col., 2014; trucha común: Castro y col., 2008) y elasmobranquios (pintarroja: Sueiro y col., 2004, Rodríguez-Moldes y col., 2011; Quintana-Urzainqui y col., 2014). Asimismo, no se apreció colocalización de HuC/D y el marcador específico glial S100 β en el cerebro del pez cebra (Grandel y col., 2006). La comparación de los resultados obtenidos en el presente estudio con este anticuerpo primario con aquéllos previamente publicados en el mágil empleando marcadores gliales tales como vimentina o la proteína ácida fibrilar glial-GFAP (Arochena y col., 2004) parecen indicar que el anti-HuC/D usado también es específico para neuronas en este teleósteo. Al ser utilizado exclusivamente como un marcador neuronal, no se realizaron controles adicionales con este anticuerpo.

Western-blotting

Para probar si el anticuerpo contra la carnosina reacciona con proteínas naturales del cerebro de peces, se obtuvieron y analizaron mediante western blot extractos proteicos de cerebros de tres mágiles adultos (previamente anestesiados). Los cerebros fueron mecánicamente homogenizados en una solución tamponada fría que contenía Tris 50 mM pH 7,6 (Sigma-Aldrich), EDTA 5 mM (Sigma-Aldrich), NaCl 150 mM, e inhibidores de proteasas tales como 2-mercaptoetanol 2 mM, leupeptina, aprotinina, pepstatina y PMSF (Sigma-Aldrich), y la concentración de proteínas del sobrenadante obtenido por centrifugación determinada mediante el método de Bradford (1976). La separación electroforética de las proteínas y péptidos se llevó a cabo en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico al 17% durante 1,5 h con un voltaje constante de 150 V (Mini-Protean II PAGE System, Bio-Rad, Richmond, CA), aplicándose 40 μ g de proteína por pocillo en tampón de carga, así como marcadores de peso molecular conocido (Sigma-Aldrich; SDS6H2, M3546). Las proteínas electroforéticamente separadas fueron transferidas en un sistema

Transblot SD (Bio-Rad) a una membrana de nitrocelulosa de tamaño de poro 0,2 μm (Bio-Rad) a 100 V durante 1 hora. Los lugares de unión inespecíficos fueron bloqueados mediante incubación durante toda la noche a 4°C en TFS con un 5% de leche descremada en polvo y un 0,2 % de Tween-20. Las membranas fueron incubadas durante 24 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo policlonal contra la carnosina diluido 1/400 en TFS con 0,2 % de Tween-20 y 5% de leche descremada en polvo. Los restantes pasos se indican en el apartado correspondiente a la detección inmunohisquímica de la carnosina mediante el método del ABCComplex. Ninguna banda proteica fue observada en este tipo de control.

Adquisición y procesamiento de las imágenes

Las fotografías de campo claro se tomaron con una cámara digital DXM1200 acoplada a un microscopio Nikon, siendo posteriormente procesadas utilizando sistemas digitales (Corel photopaint 17.0: Corel, Ottawa, Canadá). Las microfotografías de inmunofluorescencia se tomaron con una cámara digital DXM1200 acoplada a un microscopio de barrido láser confocal Leica TCS-SP2 (Leica Microsystems Heidelberg, Alemania).

Las imágenes confocales se corresponden con proyecciones de 6 secciones de 1 μm de espesor óptico realizadas en el microscopio Leica TCS-SP2. El brillo y contraste de las imágenes digitales fue ajustado con el programa Photoshop (Adobe, San José, CA). Las composiciones finales fueron realizadas con Corel Draw 17 (Corel, Ottawa, Canadá), algunas de las cuales (Figs. n*) fueron adaptadas/modificadas reemplazando colores con el programa ImageJ, programado en Java desarrollado en el National Institutes of Health (Bethesda, Maryland).

Los esquemas correspondientes a las secciones transversales del cerebro del mágil se obtuvieron mediante cámara clara (acoplada a un microscopio óptico de campo claro). Tras escanear los perfiles obtenidos, se usó el programa Corel ocr-trace 17.0 para proceder a su vectorización, siendo finalmente retocados y montados en figuras mediante Corel Draw 17.0 (Corel). Las dimensiones celulares se obtuvieron utilizando el programa ImageJ, programado en Java desarrollado en el National Institutes of Health (Bethesda, Maryland).



Resultados

Resultados



Los resultados de este estudio inmunohistoquímico (usando tanto el método de la estreptavidina-biotina como el método de inmunofluorescencia indirecta) demostraron, por primera vez en un teleósteo (Lamas y col., 2007a, ver anexo I), la presencia de inmunorreactividad a la carnosina y/o dipéptidos relacionados, tanto en neuronas y fibras como en células gliales en el cerebro del mágil (tabla 1).

WESTERN BLOTTING Y CONTROLES DE ESPECIFICIDAD

El anticuerpo empleado en el presente trabajo ha sido utilizado en estudios previos, marcando específicamente estructuras carnosina y carnosina-like en distintas especies de mamíferos, aves, reptiles y anfibios.

La especificidad del anticuerpo usado (donado gentilmente por el Dr. Margolis) fue verificada mediante western-blot y la realización de controles inmunohistoquímicos en los que se omitió el anticuerpo primario o éste fue preadsorbido con conjugados carnosina-BSA antes de ser añadido a las secciones de cerebro de mágil. El análisis mediante western-blot de extractos proteicos de cerebro de mágil no mostró banda alguna (Fig. 6), indicando que el anticuerpo primario utilizado en este estudio no reconoce proteínas naturales del encéfalo con pesos moleculares detectables en la técnica, sino que sólo reconoce la carnosina o péptidos relacionados, cuyos pesos moleculares son mucho más bajos. Asimismo, la preadsorción del anticuerpo con el conjugado carnosina-BSA, así como la omisión del anticuerpo primario, abolió por completo todo inmunomarcaje.

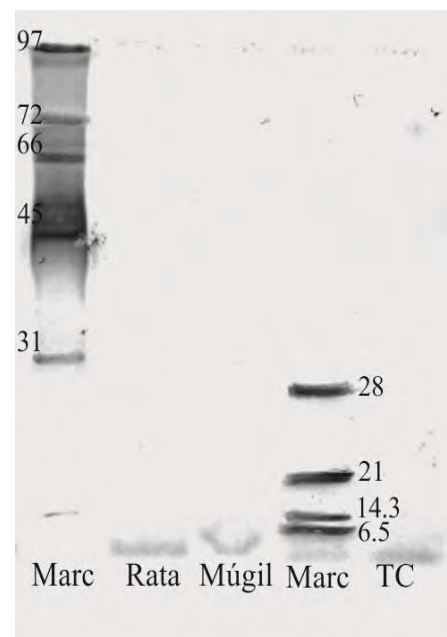


Fig. 6. Western-blotting de extractos de cerebro de mágil y rata. Las bandas indican el peso molecular (kDa) de los marcadores empleados (Marc). TC (tampón de carga).

		Núcleos/regiones con poblaciones neuronales Car-ir	Regiones con poblaciones gliales Car-ir
Telencéfalo	Área dorsal telencefálica	Dc, Dm, Dld, Dlv, Dlp, Dd, Dp	Epéndimo Dm
	Área ventral telencefálica	Vd, Vv, Vl, Vc, Vs, E, Vi	Subepéndimo Vv
Diencefalo	Área preóptica	mPO, pPO	NO
	Hipotálamo y tubérculo posterior	NTL, NTA, PG, GR, CN	-----
	Tálamo	DT, VT	Subepéndimo DT y VT
	Epitálamo	Ha	Ha lateral
	Pretecho	PSP, PA	-----
Mesencéfalo	Techo óptico	SP, SAC, SGC, SFGS, SO, Co, TL	CP, TO
	Tegmento mesencefálico	TS, Nflm, NmesV, III, IV, NLV,	Epéndimo
Rombencéfalo	Región del istmo	NI, LC, Nip, NGS, SR, GC	-----
	Cerebelo	CM, CGL, CGr	
	Bulbo raquídeo	mV, VIr, VIc, VIIIm, IXm, Xm, ganglio del X, VIIIIm, VIIIIt, Cr, FR, Cvs	

Tabla 1. Resumen de los núcleos/regiones Car-ir en el encéfalo del mágil adulto.

CARNOSINA Y/O DIPÉPTIDOS RELACIONADOS EN FIBRAS Y POBLACIONES NEURONALES EN EL ENCÉFALO DEL MÚGIL ADULTO

Los resultados obtenidos demuestran que la carnosina y/o dipéptidos relacionados tiene una amplia distribución en el encéfalo del mágil. Mayoritariamente, las células inmunorreactivas a la carnosina (Car-ir) observadas se correspondían con neuronas (Figs. 7-28) y, aunque la inmunotinción de los cuerpos neuronales era más intensa, también se apreciaron fibras marcadas.

Si bien la morfología y distribución sugerían que se trataba de neuronas, la tipología particular de las células Car-ir fue comprobada mediante inmunofluorescencia indirecta doble, empleando tanto anticuerpos contra la carnosina como anticuerpos contra la proteína neuronal HuC/D. Así, todas las células Car-ir identificadas como neuronas también expresaban el marcador neuronal HuC/D, aunque un gran número de células HuC/D-ir no eran carnosina inmunorreactivas.

El cerebro del mágil adulto contiene un gran número de neuronas carnosina-inmunorreactivas (Car-ir) distribuidas en las diferentes regiones del telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo (Fig. 7).

Telencéfalo

El telencéfalo del mágil presenta distintas poblaciones neuronales Car-ir, distribuidas tanto a nivel palial como subpalial. A diferencia de lo observado en los hemisferios telencefálicos, los bulbos olfatorios del mágil carecen de inmunorreactividad a la carnosina.

Telencéfalo dorsal o palio

El área dorsal del telencéfalo (palio) del mágil presenta diversas poblaciones inmunorreactivas a la carnosina. El estudio de la distribución de la carnosina junto con el marcador neuronal HuC/D, mediante técnicas de doble inmunofluorescencia, indica/revela una colocación de ambas sustancias en todas las zonas del telencéfalo dorsal y que, dichas poblaciones son de naturaleza neuronal. La distribución de la carnosina en el telencéfalo dorsal del mágil comprende: zona central (Dc), zona medial (Dm), zona lateral y sus subdivisiones dorsal, ventral y posterior (Dld, Dlv y Dlp respectivamente), zona dorsal (Dd) y zona posterior (Dp).

La población más rostral del telencéfalo dorsal se observa en la zona central (Dc). Un estudio realizado en el telencéfalo del mágil, utilizando el marcador neuronal HuC/D, en la identificación de las diferentes zonas del telencéfalo (resultados no publicados), reveló, al igual que en otros teleósteos, que la zona central del telencéfalo dorsal se puede subdividir en dos partes o regiones, una rostral (Dc1) y otra caudal (Dc2). La inmunorreactividad a la carnosina, se distribuye rostrocaudalmente, agrupando estas dos subdivisiones, constituyendo en esta zona la

única zona rostral Car-ir que persiste en el telencéfalo caudal del múgil. Las células de la zona más rostral (Dc1) se sitúan lateralmente a la zona medial del telencéfalo dorsal, distribuyéndose de manera muy dispersa, de modo que se pueden observar grandes espacios interneuronales (Figs. 7B, C, 8A, C). Las neuronas Car-ir de la zona Dc1, presentan un soma redondeado con un diámetro aproximado de 10 μm . A niveles más caudales, la zona central reduce su extensión, observándose neuronas más agrupadas con una morfología igualmente redondeada como las pertenecientes a la subdivisión más rostral, pero con un tamaño mayor (15 μm de diámetro). A este nivel, Dc2 limita lateralmente con las subdivisiones dorsal (Dld) y ventral (Dlv) de la zona lateral del palio, y más caudalmente con las subdivisiones dorsal (Dld) y posterior (Dlp) de esta misma zona palial (Figs. 7D, E, 8B).

En niveles rostrales del telencéfalo dorsal y situadas lateralmente a la zona central (Dc1), se observaron células Car-ir en la zona medial (Dm). Éstas presenta cuerpos neuronales de pequeño tamaño, redondeados y con un diámetro que ronda los 5 μm ; asimismo algunos somas presentan prolongaciones cubiertas de botones sinápticos (Figs. 7B-D, 8C). Estas neuronas Car-ir de la zona medial se van dorsalizando en niveles más caudales telencefálicos hasta colindar con la población neuronal Car-ir perteneciente a la zona dorsal del telencéfalo dorsal (Dd).

La zona lateral del área dorsal telencefálica es bastante extensa y, al menos, presenta tres subdivisiones diferentes (Nieuwenhuys, 1963; Northcutt y Braford, 1980): la subdivisión dorsal (Dld), la subdivisión ventral (Dlv) y la subdivisión posterior (Dlp), todas ellas distinguibles en el múgil.

En zonas rostrales, (Dld) se encuentra situada dorsalmente a (Dlv) y lateralmente a la zona dorsal del telencéfalo dorsal (Dd). Dld presentan células dispersas de tamaño pequeño (6 μm de diámetro) y somas de morfología ovoidal o redondeada (Figs. 7D, E, 8E, F, 9A). Situada ventralmente a Dld y lateroventralmente a Dc, se encuentra Dlv, cuyas células presentan un tamaño parecido al de las células de la subdivisión dorsal, si bien su inmunorreactividad a la carnosina es algo más tenue que en el caso de las células de la subdivisión dorsal (Figs. 7D, 8F, 9B, C).

A niveles más caudales de esta zona lateral del telencéfalo dorsal, la subdivisión ventral es reemplazada por la subdivisión posterior (Dlp), situada ventrolateralmente

a la subdivisión dorsal (Dld) y a la subdivisión más caudal de la zona central del telencéfalo dorsal (Dc2). Dlp se caracteriza por presentar células con una gran inmunorreactividad a la carnosina, lo cual permite que se diferencie de manera muy evidente el límite ventral de esta subdivisión con respecto a la zona posterior del telencéfalo dorsal (Dp), que está situada ventralmente. Las células Car-ir de Dlp se encuentran densamente agrupadas y presentan una morfología redondeada con un diámetro medio de 11 μm (Figs. 7E, 9D).

La zona dorsal del telencéfalo dorsal (Dd) se sitúa entre la zona medial (Dm) y la subdivisión dorsal de la zona lateral del telencéfalo dorsal (Dld). En el mágil comprende una pequeña área del telencéfalo dorsal, pero se pueden identificar claramente sus límites debido a que las células inmunorreactivas a la carnosina de esta zona se encuentran bastante más agrupadas que en caso de otras subdivisiones. Las células Car-ir de esta zona presentan un tamaño bastante pequeño (6,5 μm de diámetro) y una morfología redondeada (Figs. 7D, 8D).

La última zona que se describe para el área dorsal telencefálica se corresponde con la zona posterior (Dp), que en parte se corresponde a la porción posterior de la zona lateral de Nieuwenhuys. Se encuentra situada ventralmente a la subdivisión posterior de la zona lateral del telencéfalo dorsal (Dlp), y establece su límite medio-dorsal con la zona central caudal del telencéfalo dorsal (Dc2). Dp presenta una gran cantidad de células inmunorreactivas a la carnosina, más o menos redondeadas y con un diámetro de unos 10 μm . Estas células se encuentran más densamente empaquetadas en su zona más ventral (Figs. 7E, 9D, E, F), lo cual permite establecer el límite entre las dos poblaciones neuronales (Dlp y Dp).

Telencéfalo ventral o subpalio

La inmunorreactividad a la carnosina en el subpalio del mágil se distribuye en varios núcleos de este área no evertida del telencéfalo, desde zonas situadas rostralmente a la comisura anterior hasta zonas que se sitúan al mismo nivel o caudales a esta comisura. Rostralmente, se pueden apreciar células Car-ir presentes en los núcleos periventriculares dorsal (Vd) y ventral (Vv), el núcleo lateral (Vl) y el núcleo central (Vc). A nivel comisural se observaron neuronas Car-ir en el núcleo supracomisural (Vs) y caudalmente a la comisura anterior en el núcleo entopeduncular (E) y núcleo

intermedio (Vi). En todos estos núcleos del subpalio del mágil, las células inmunorreactivas a la carnosina observadas colocalizan con el marcador neuronal HuC/D, poniendo de manifiesto su naturaleza neuronal.

La población neuronal que aparece en los niveles más rostrales, junto con la zona central del telencéfalo dorsal (Dc), es la correspondiente al núcleo dorsal del área ventral telencefálica (Vd), localizado en la zona periventricular y situado dorsalmente al núcleo ventral (Vv). Caudalmente, Vd se va dorsalizando y extendiéndose lateralmente. Las células Car-ir que integran Vd exhiben somas redondeados con un diámetro que ronda los 12 μm apareciendo densamente agrupadas sobre todo en la zona periventricular (Figs. 7C, D, 10A, B).

Situado ventralmente al núcleo dorsal del telencéfalo ventral (Vd), el núcleo ventral (Vv) presenta células con una inmunorreactividad a la carnosina algo más intensa y una distribución más agrupada. El soma de estas células es más o menos redondeado y de tamaño similar al presentado por las células Car-ir de Vd (Figs. 7C, D y 10A, B). Este núcleo ventral presenta una lateralización algo mayor que el núcleo dorsal, si bien parece que este último (Vd) ocupa un área mayor en el plano dorso-ventral.

Situado ventrolateralmente al núcleo central del telencéfalo ventral y separado de la subdivisión ventral de la zona lateral del telencéfalo dorsal (Dlv) mediante el surco entorrinal, el núcleo lateral del telencéfalo ventral (Vl) presenta células Car-ir dispersas y de aspecto ovoidal, incluso algunas exhiben una morfología fusiforme (Figs. 7D, 10C). El tamaño de estas células varía ligeramente; así las células Car-ir de morfología ovoidal presentan un tamaño aproximado de 14x16 μm , mientras que el de las fusiformes era de 10x20 μm .

Otra población neuronal Car-ir observada en porciones algo rostrales a la comisura anterior es la que aparece a nivel del núcleo central del telencéfalo ventral (Vc), la cual está formada por células intensamente inmunorreactivas a la carnosina, que se disponen formando agregados a modo de columnas entre tractos laterales (Figs. 7D, 10E). Estas células se localizan lateralmente al surco entorrinal, presentando un soma redondeado con un diámetro aproximado a los 12 μm .

A la altura de la comisura anterior y dorsalmente con respecto a ésta, se pueden observar células Car-ir asociadas al núcleo supracomisural (Vs). Se trata de una

población neuronal periventricular que está formada por células redondeadas de tamaño pequeño (8 μm de diámetro), las cuales aparecen más densamente agrupadas hacia la zona ventricular formando agrupaciones paralelas a las paredes del ventrículo telencefálico (Figs. 7E, 10D).

A nivel postcomisural, se encuentra un pequeño grupo de neuronas Car-ir en el núcleo entopeduncular (E), situado dorsalmente al fascículo telencefálico lateral. Las neuronas de este núcleo se extienden a modo de lámina sobre el fascículo y presentan una intensa inmunorreactividad a la carnosina. Presentan una morfología ovoidal con un tamaño aproximado de 8x12 μm (Figs. 7F, 10F). Situado lateroventralmente al fascículo telencefálico lateral (flt), se observó un grupo de neuronas Car-ir densamente agrupadas (Figs. 7F, 10F) que se corresponden con la población neuronal perteneciente al núcleo intermedio del telencéfalo ventral (Vi). Estas neuronas con morfología redondeada tienen un diámetro de unos 5 μm .

Diencefalo

Sin duda, el diencefalo del mágil constituye la subdivisión encefálica con mayor número de poblaciones neuronales Car-ir, presentando asimismo células gliales inmunomarcadas.

Región preóptica

Caudalmente a la comisura anterior aparece el receso preóptico anterior; y en posición lateral a éste se observan grandes neuronas con una inmunorreactividad moderada a la carnosina pertenecientes al núcleo preóptico magnocelular. La carnosina parece estar localizada principalmente en zonas citoplasmáticas celulares ya que puede observarse los núcleos neuronales redondeados sin inmunorreactividad (Figs. 7E, F, 11A, B). Estas células poseen un cuerpo neuronal ovoidal de gran tamaño (12x18 μm de diámetro), y una naturaleza secretora (Gómez-Segade y Anadón, 1986). Este núcleo se va dorsalizando rostrocaudalmente hasta situarse en las paredes del tercer ventrículo. Dorsalmente al núcleo preóptico magnocelular en sus porciones rostrales, se pueden observar igualmente neuronas Car-ir en la parte parvocelular de esta región (Figs. 7E, 11A), presentando estas neuronas una morfología redondeada con un diámetro aproximado a los 8 μm .

Hipotálamo y tubérculo posterior

Como en otros teleósteos, el hipotálamo del múgil consiste en un lóbulo tuberal medial y dos lóbulos inferiores. El lóbulo tuberal rodea el tercer ventrículo, el cual se expande lateralmente dando lugar a un par de divertículos conocidos como recesos laterales. En el múgil se observaron células Car-ir en el núcleo lateral y anterior del túber, complejo preglomeruloso, núcleo glomeruloso, núcleos difusos y centrales de los lóbulos inferiores hipotalámicos.

Ventralmente a la comisura horizontal se encuentra el receso infundibular o hipotalámico. Junto con el núcleo preóptico magnocelular, el núcleo lateral del túber constituye uno de los dos centros neurosecretores clásicos del diencéfalo. Las células de la parte medial del núcleo lateral del túber muestran una inmunorreactividad moderada a la carnosina, presentando un gran tamaño y soma ovalado (Fig. 7G). Asimismo, en el núcleo anterior del túber se observaron células Car-ir situadas muy próximas al receso infundibular, extendiéndose lateralmente en el núcleo del receso lateral (Figs. 7H, 11F). Característicamente estas células presentan una morfología ovoidal y un tamaño aproximado a los $8 \times 10 \mu\text{m}$.

A nivel postquiasmático, rostralmente a la comisura horizontal y en la base del hipotálamo, se observa un neuropilo con algunas neuronas moderadamente inmunorreactivas a la carnosina que se corresponden con el par lateral del núcleo preglomeruloso. Este núcleo se va haciendo más lateral a medida que se avanza caudalmente, y a nivel del toro lateral, el núcleo preglomeruloso par lateral va abandonando su posición hasta situarse gradualmente medial al núcleo glomeruloso. A este nivel, las neuronas observadas pertenecen al par medial del núcleo preglomeruloso mostrando un soma ovoidal intensamente inmunorreactivo a la carnosina en zonas citoplasmáticas neuronales y un tamaño de $8 \times 10 \mu\text{m}$ (Figs. 7F-H, 11C).

El núcleo glomeruloso (núcleo rotundus de Fritzsche, 1878) es el núcleo más característico del tubérculo posterior, tanto en el múgil como en otros peces actinopterygios. Este núcleo está compuesto por glomérulos (zonas redondeadas ocupadas por neuropilo) entre los que se encuentran neuronas de tamaño pequeño y medio. Los glomérulos muestran una inmunorreactividad moderada a la carnosina y

entre ellos se observan algunas neuronas Car-ir. Por sus dimensiones y localización se pueden diferenciar dos tipos de células Car-ir: unas de morfología ovoidal y tamaño medio ($8 \times 12 \mu\text{m}$) situadas a modo de anillo en la periferia del núcleo, y otras de menor tamaño ($6 \times 8 \mu\text{m}$) distribuidas por las zonas centrales del núcleo (Figs. 7I, 11D, E).

En la parte más rostral de los lóbulos hipotalámicos únicamente se aprecia inmunorreactividad a la carnosina en el neuropilo asociado. Por el contrario, en sus porciones caudales se pueden apreciar pequeñas neuronas inmunorreactivas a la carnosina, dispersas por territorios laterales y mediales con respecto a los recesos laterales hipotalámicos, formando el núcleo difuso de los lóbulos hipotalámicos inferiores (Fig. 7J) y, en porciones más caudales, el núcleo central de los lóbulos hipotalámicos inferiores (Fig. 7J).

Tálamo

En el tálamo del mágil, se pueden distinguir células Car-ir en los dos núcleos principales descritos en teleósteos avanzados dentro de esta región (Gómez-Segade y Anadón, 1988): núcleos dorsomedial y ventromedial.

El núcleo talámico dorsomedial se encuentra situado en la región periventricular (al tercer ventrículo) del tálamo dorsal, contiene neuronas Car-ir de tamaño medio-grande ($10 \times 20 \mu\text{m}$ de diámetro) y morfología ovoidal, presentando además unos procesos celulares inmunopositivos que se dirigen lateralmente en dirección opuesta a la línea media (Figs. 7F-H, 12A, C).

El principal núcleo del tálamo ventral es el núcleo ventromedial, constituido por una columna de células paralelas a la línea media. Las células Car-ir observadas en este núcleo presentan un tamaño menor al de las células del núcleo dorsomedial ($10 \times 12 \mu\text{m}$) y apariencia ovoidal, en algunos casos fusiforme (Figs. 7 F-H, 12A, C).

Epitálamo

Las únicas estructuras inmunorreactivas a la carnosina apreciadas en el epitálamo del mágil se corresponden con células localizadas en las porciones dorsal y ventral de la habenula (Figs. 7F, 12D, F, G). En esta estructura también se aprecian algunos terminales sinápticos así como fibras de escaso grosor Car-ir dispersas (Fig. 12G).

Pretecho

La zona pretectal del múgil contiene una población celular inmunorreactiva a la carnosina localizada en la superficie lateral de la base del techo óptico, a nivel del núcleo pretectal superficial parvocelular. Este núcleo presenta un neuropilo Car-ir en el que se encuentran neuronas de aspecto redondeado (Figs. 7F, 12H). Esta no es la única población Car-ir observada en la región pretectal del múgil. Lateroventralmente a la comisura posterior se puede apreciar un grupo de células de apariencia ovoidal y tamaño medio ($8 \times 10 \mu\text{m}$) que parecen integrar la población correspondiente al núcleo de la comisura posterior (Figs. 7G, 12A, C).

Mesencéfalo

El mesencéfalo se encuentra situado caudalmente al pretecho y tubérculo posterior. En él se pueden distinguir dos regiones diferentes: el techo óptico y el tegmento mesencefálico, ambas con numerosas poblaciones neuronales Car-ir.

Techo óptico

El techo mesencefálico o techo óptico constituye uno de los principales centros de integración de señales sensoriales y motoras en peces teleósteos. El techo óptico del múgil contiene numerosas células y fibras Car-ir en los diferentes estratos que lo componen, abarcando la distribución de la carnosina los estratos: periventricular (SP), estrato blanco central, estrato gris central (SGC), estrato fibroso y gris superficial (SFGS) hasta el estrato óptico (SO).

En el estrato periventricular (SP) se pueden observar numerosas células Car-ir apariencia redondeada y tamaño medio grande ($15 \mu\text{m}$ de diámetro). En el caso del múgil esta capa se encuentra característicamente separada de la superficie ventricular por una amplia región constituida fundamentalmente por glia (ver Arochena y col., 2004). Por su localización y características estas células Car-ir del estrato periventricular probablemente se corresponden con las neuronas tipo XIV descritas en el carpín dorado por Meek y Schellart (1978) (Figs. 7H-J, 13A, C).

Inmediatamente por encima de SP se encuentra el estrato blanco central (SAC). Las células Car-ir de este estrato presentan una moderada inmunorreactividad a la carnosina, además de un tamaño mayor a las de SP ($18 \times 22 \mu\text{m}$) y un pericarion

ovoidal o piriforme (Figs. 7H, I, 13A, C, 14A, C). Estas células podrían corresponderse con las del tipo XIII descritas por Meek y Schellart (1978) en el carpín dorado y caracterizadas por tener cuerpos celulares multipolares situados en este estrato y dendritas desde el SAC al estrato óptico (SO).

Dentro del estrato gris central (SGC) del techo óptico del mágil, se observaron dos poblaciones neuronales Car-ir de diferentes tamaños (Figs. 7H, I, 13A, C, 14A, C). Las más grandes, de aspecto ovoidal y un tamaño aproximado de 18x24 μm , podrían corresponderse con las células de tipo XII, y las de menor tamaño (8 μm de diámetro) y soma redondeado, con las de tipo X descritas por Meek y Schellart (1978).

Las escasas neuronas Car-ir situadas en el estrato fibroso y gris superficial (SFGS) presentan una morfología redondeada y diámetro medio que ronda los 10 μm (Figs. 7H, I, 14A, C), pero no se puede asegurar si se corresponden con las células del tipo I o VI de Meek y Schellart (1978). El último estrato donde se observaron células Car-ir es el estrato óptico, el cual presenta escasas neuronas más o menos redondeadas (Figs. 7H, I, 14A, C) que podrían corresponderse a las células tipo III de Meek y Schellart (1978).

En regiones caudales del estrato gris central (SGC) se pueden observar una gran cantidad de fibras Car-ir orientadas de manera oblicua y paralelas al estrato blanco central (SAC), las cuales podrían corresponder con dendritas procedentes de la neuronas Car-ir del estrato gris central o también del estrato blanco central (Figs. 7I, 15A, C, D).

En el límite entre la parte rostral del techo óptico y el pretecho del mágil, como en otros teleósteos avanzados, hay un grupo neuronal compacto llamado núcleo cortical de Fritsch (1878) (ver Gómez-Segade y Anadón, 1988). En el mágil, este núcleo presenta una intensa inmunorreactividad a la carnosina y está formado por neuronas con diámetro medio-grande (20x30 μm) y somas ovoidales o piriformes (Figs. 7F, G, 17A, C, 18A, C, D), formando una lámina característica con células dispuestas en varias capas que separan el área pretectal y el techo óptico en la región de entrada de los tractos fasciculares ópticos.

El toro longitudinal es una estructura típica de peces actinopterigios. Se localiza bajo la línea media del techo óptico, con el cual está estrechamente relacionado. En el mágil, el toro longitudinal presenta numerosas células redondeadas de pequeño tamaño (de tipo granular) distribuidas a lo largo de toda su extensión, así como neuronas de aspecto globular con un tamaño aproximado de $7 \times 14 \mu\text{m}$ y localizadas principalmente en la región dorsomedial, próximas a los haces de fibras que relacionan esta estructura con el techo óptico. Ambos tipos de células mostraban inmunorreactividad a la carnosina, aunque las neuronas de mayor tamaño, presentaban una inmunorreactividad más intensa en comparación con las células granulosas de menor tamaño (con un diámetro medio de $8 \mu\text{m}$). Además de neuronas Car-ir, el toro longitudinal contiene numerosas fibras inmunorreactivas a la carnosina (Figs. 7I, 19A, C, D, E).

Tegmento mesencefálico

El tegmento mesencefálico constituye la región ventral del mesencéfalo, localizándose la mayoría de las agrupaciones neuronales en posiciones ventromediales y periventriculares. Buena parte de estas poblaciones expresan carnosina, incluyendo el toro semicircular, el núcleo del fascículo longitudinal medial, el núcleo mesencefálico del nervio trigémino, el núcleo del nervio oculomotor, el núcleo del nervio troclear y el núcleo lateral de la válvula.

El toro semicircular es otra de las regiones distinguibles en el tegmento mesencéfalo, disponiéndose periventricularmente a modo de protusión o eminencia en el ventrículo mesencefálico, bajo el techo óptico. Las numerosas neuronas Car-ir observadas en el toro semicircular del mágil exhiben una morfología ovoide, o incluso fusiforme, con uno tamaño aproximado de $12 \times 15 \mu\text{m}$ de diámetro localizándose éstas fundamentalmente en sus regiones centrales (Figs. 7I, 20A).

El núcleo del fascículo longitudinal medial se localiza en la porción rostral del tegmento mesencefálico y las neuronas asociadas a este núcleo que presentan Car-ir tienen un soma ovoidal de gran tamaño ($20 \times 35 \mu\text{m}$ de diámetro), localizándose en el tegmento dorsal a ambos lados de la línea media y laterodorsales al fascículo longitudinal medial (Figs. 7I, 20B).

En porciones algo más rostrales al núcleo del fascículo longitudinal medial, se

observan algunas neuronas Car-ir situadas periventricularmente, que parecen corresponderse al núcleo mesencefálico del nervio trigémino. Estas neuronas son típicamente monopolares y su prolongación, también Car-ir, sale ventralmente en dirección opuesta al ventrículo (Fig. 7I).

Las neuronas Car-ir del núcleo del nervio oculomotor se observan a niveles ligeramente caudales al núcleo del fascículo longitudinal medial y se disponen dorsomedialmente a este fascículo. Está formado por neuronas grandes (20x35 μm), de aspecto piriforme y una intensa inmunorreactividad a la carnosina; asimismo su prolongación axónica también es Car-ir, la cual aparece orientada hacia el fascículo longitudinal medial (Figs. 7J, 20C).

Caudalmente al núcleo oculomotor se sitúa el núcleo del nervio troclear, mostrando sus células una moderada inmunorreactividad. Estas células, localizadas dorsalmente al fascículo longitudinal medial, poseen un cuerpo celular ovalado de notable tamaño (30x35 μm), del cual parte un axón también Car-ir más o menos conspicuo en dirección ventrolateral (Figs. 7J, 20F).

En posición dorsomedial (dentro del tegmento mesencefálico), se puede apreciar una población Car-ir a nivel del núcleo lateral de la válvula. Se trata de neuronas de pequeño tamaño (10 μm de diámetro) y aspecto ovalado, situadas en posición periventricular y lateralmente al núcleo troclear, apareciendo éstas más densamente agrupadas en posiciones dorsales del núcleo (Figs. 7J, 20D).

Rombencéfalo

Región del istmo

Esta zona de transición entre el mesencéfalo y el rombencéfalo contiene distintas poblaciones neuronales Car-ir incluyendo el núcleo del istmo, *locus coeruleus*, núcleo interpeduncular, núcleo gustatorio secundario y núcleo superior del rafe.

En el mágil, el núcleo del istmo está formado por una corona de células piramidales o poligonales de pequeño tamaño (7x10 μm de diámetro) moderadamente inmunorreactivas a la carnosina organizadas alrededor de un amplio neuropilo central y en el que se pueden observar algunas (pocas) fibras también inmunorreactivas a la carnosina (Figs. 7J, 20E).

Caudalmente al núcleo del istmo y ventrolateral al núcleo gustatorio secundario se localiza una agrupación de neuronas Car-ir que se corresponden con la agrupación del *locus coeruleus*. Se trata de neuronas de gran tamaño (35x50 μm) que exhiben una inmunorreactividad moderada a la carnosina y aparecen cubiertas de terminales sinápticos inmunorreactivos localizados tanto sobre la superficie del soma como sobre el cono axónico (Figs. 7K, 21A).

A niveles caudales mesencefálicos puede observarse otra población moderadamente inmunorreactiva a la carnosina en el suelo del tegmento ístmico, la cual se corresponde a las células del núcleo interpeduncular. Exhibe neuronas de pequeño tamaño (10x12 μm de diámetro) así como en botones sinápticos Car-ir sobre sus somas (Fig. 1J, 21E).

Dorsolateralmente al *locus coeruleus* se localiza el núcleo gustatorio secundario que exhibe neuronas ovoidales Car-ir con un tamaño de 16x25 μm densamente agrupadas en su parte ventral. A niveles más rostrales este núcleo aparece localizado ventromedialmente al cuarto ventrículo y en porciones más caudales se va dorsalizando hasta alcanzar posiciones dorsomediales con respecto a dicho ventrículo (Figs. 7K, 21B, C).

Bajo el cuarto ventrículo y dorsalmente al fascículo longitudinal medial, se pueden apreciar algunas células Car-ir en la región correspondiente a la gris central. Morfológicamente son células redondeadas y de tamaño medio (15 μm) con una intensa inmunorreactividad a la carnosina (Figs. 7K, 21D).

Las neuronas del núcleo superior del rafe, situadas en posición medial al fascículo longitudinal medial y dorsales al núcleo interpeduncular, muestran una inmunorreactividad moderada a la carnosina (Fig. 7K).

Cerebelo

Como en otros teleósteos, el cerebelo de múgil está formado por un cuerpo cerebeloso, una válvula cerebelosa y las eminencias granulares. Todas estas partes contienen neuronas Car-ir. En el cuerpo cerebeloso y válvula cerebelosa, la población más inmunorreactiva a la carnosina más destacable se localiza en la capa ganglionar, situada entre la capa molecular y la capa granular.

Las células Car-ir de la capa ganglionar de la válvula cerebelosa están situadas principalmente en la región ventral, mientras que en el cuerpo cerebeloso se observaron en regiones dorsales, laterales y ventrales, cerca de la capa molecular. Estas células tienen un soma piriforme, con un tamaño aproximado de 12x18 μm , sobre el cual se observa la presencia de botones sinápticos Car-inmunorreactivos (Figs. 7J-O, 23A, C, D, 24A, C, D, F, G, H). Estas células también son Hu C/D inmunorreactivas (Figs. 23B, 24B), lo que confirma su naturaleza neuronal. Existen dos tipos neuronales en la capa ganglionar cerebelosa: las células de Purkinje y las células euridendroides que se diferencian entre sí por la presencia o no de dendritas espinosas en su árbol dendrítico, las cuales son inmunonegativas a la carnosina. La localización inmunohistoquímica de la carnosina junto con la de calretinina que marca células euridendroides en el múgil (Díaz-Regueira y col., 2000) y la de parvalbúmina que marca células de Purkinje en teleósteos (Alonso y col., 1992), confirma a las células de Purkinje como la población que expresa carnosina en el cerebelo del múgil.

En la capa granular de las tres regiones cerebelosas se observó una población neuronal Car-ir, unas con un tamaño mediano, cuerpo redondeado y organizadas de manera dispersa (Figs. 7J-O, 22A, C, D, E, 23A, C, D) pudiendo corresponderse con células de Golgi con un tamaño medio-grande de 18 μm . Las células granulares HuC/D inmunorreactivas, son negativas en cuanto al marcaje con la carnosina y entre ellas se observó fibras Car-ir que parecen corresponder con alargamientos de fibras musgosas del glomérulo cerebeloso (Fig. 22E). En la capa molecular cerebelosa también se aprecian neuronas Car-ir, situadas de manera dispersa y en bajo número. Estas neuronas exhiben un soma más o menos redondeado de pequeño tamaño (8 μm de diámetro) y podrían corresponder con células estrelladas (Figs. 7J-O, 23A, C, D, 24E).

La válvula cerebelosa del múgil está unida al tegmento mesencefálico a través de un pequeño núcleo celular, el núcleo lateral de la válvula, el cual es uno de los principales núcleos precerebelosos de teleósteos. Las células de este núcleo muestran entre leve y moderada inmunorreactividad a la carnosina (Figs. 7J, 20D). Estas células podrían ser el origen de las fibras musgosas Car-ir observadas a lo largo de todo el cerebelo.

Bulbo raquídeo

El bulbo raquídeo puede considerarse la continuación caudal del tegmento mesencefálico, distinguiéndose en el mismo diversas poblaciones neuronales inmunorreactivas a la carnosina que rostrocaudalmente, se corresponderían con: el núcleo motor del nervio trigémino (V par), núcleo del nervio abducente (VI par), núcleo del nervio facial (VII par), núcleo del nervio glosofaríngeo (IX par), núcleo del nervio vago (X par), ganglio del vago, núcleos tangencial y vestibular magnocelular del nervio vestibular (VIII par), cresta cerebelosa, núcleos reticulares y columna viscerosensorial.

La agrupación Car-ir más rostral aparece a nivel del núcleo motor del nervio trigémino (V par). Este núcleo se divide en una porción anterior (dorsal) y otra caudal (ventrolateral). El núcleo anterior del nervio V está constituido por neuronas grandes (25x50 μm) de soma piriforme e intensamente inmunomarcadas, ocupando una posición dorsolateral al fascículo longitudinal medial, cerca del cuarto ventrículo. Sus prolongaciones Car-ir salen agrupadas en dirección ventrolateral para formar la raíz motora del nervio trigémino (Figs. 7L, 25A). El núcleo caudal del nervio V es un núcleo migrado que a su vez está formado por una agrupación dorsomedial y otra ventrolateral, ambas inmunorreactivas a la carnosina. La división dorsomedial se encuentra situada en posición ventral con respecto al núcleo anterior y está formada por neuronas grandes de aspecto fusiforme, mientras que en la división ventrolateral predominan las neuronas de soma ovalado (Figs. 7L, 25B).

La raíz descendente del trigémino es la porción sensitiva del nervio, que desciende hasta la médula espinal. A diferencia de las fibras motoras, intensamente inmunorreactivas a la carnosina, la raíz sensitiva presenta una muy tenue inmunorreactividad (Fig. 7L).

El núcleo del nervio abducente (VI par) contiene varias poblaciones de neuronas grandes y medianas de aspecto piriforme u ovalado con tamaños aproximados a los 15 μm tenuemente inmunorreactivas a la carnosina. Las neuronas de este núcleo forman una columna discontinua, situada en la zona ventral del bulbo raquídeo. El subnúcleo más rostral se observa ligeramente caudal al núcleo posterior del trigémino. Sus neuronas parecen establecer contacto con otras neuronas reticulares

situadas en posición dorsomedial a éste (Figs. 7M, 25C). El subnúcleo caudal se encuentra a nivel del fascículo *octavo motorius cruciatus*, que constituye la comisura formada por las fibras procedentes del núcleo tangencial del nervio VIII (Fig. 7N).

También pueden apreciarse neuronas Car-ir en otros dos núcleos motores de nervios craneales: el núcleo del nervio facial (VII par) y del nervio glossofaríngeo (IX par). El núcleo del nervio facial se observa a un nivel caudal al ingreso de su raíz motora. Sus neuronas, predominantemente fusiformes (20x38µm), se disponen lateroventrales al fascículo longitudinal medial (Figs. 7N, 25D). Asimismo, se observaron fibras Car-ir en la raíz motora del nervio facial. Por su parte, el núcleo motor del nervio glossofaríngeo se sitúa caudalmente al anterior y en posición parecida. Las neuronas Car-ir observadas en este núcleo son fusiformes o de contorno ovalado con unos tamaños medios de 15x38 µm, además de los procesos celulares que también se observaron Car-ir (Figs. 7Ñ, 25E).

Las neuronas del núcleo motor del nervio vago (X par) inmunorreactivas a la carnosina se sitúan en la misma región ocupada por el núcleo del nervio glossofaríngeo en porciones más rostrales, formando así una columna continua. Presenta células de un tamaño aproximado a 18x30 µm y aspecto fusiforme (Figs. 7O, 26A).

Asimismo, pueden observarse células intensamente inmunorreactivas a la carnosina en el ganglio del vago con somas ovoidales y aproximadamente un tamaño de 30x45 µm, apareciendo también marcada la raíz sensorial del vago (Figs 1O, 26E, 27A). En el mágil, el empleo de anticuerpos contra la calretinina permitió revelar las células sensoriales de los botones gustativos (Díaz-Regueira y col., 2005; ver anexo II), así como estructuras viscerosensoriales periféricas y centrales, incluidas células ganglionares vagales, algunas células del lóbulo vagal y las que forman parte del núcleo gustatorio secundario (ver Díaz-Regueira y Anadón, 2000; Díaz-Regueira y col., 2005; ver anexo II). A pesar de los estudios realizados y los resultados obtenidos, la posible relación entre la carnosina y la calretinina en estas estructuras no ha sido abordada, ni la implicación de la carnosina en el sistema gustativo de peces.

Relacionadas con el nervio VIII o vestibular, se pueden reconocer dos poblaciones

neuronales inmunorreactivas a la carnosina. Una de ellas corresponde a la parte ventral del núcleo tangencial, cuyas neuronas poseen un contorno ovalado y un diámetro aproximado a 12x24 μm , situándose en posición ventral en el bulbo raquídeo, prácticamente entre las meninges y la entrada de la raíz anterior del nervio VIII (Díaz Regueira y Anadón, 1990) (Figs. 7M, 26B). La otra población está formada por neuronas fusiformes de tamaño medio (16x28 μm) que se disponen dorsales a la raíz descendente del nervio trigémino y que pertenecen al núcleo vestibular magnocelular (Figs. 7M, 26C).

En el área de la línea lateral del múgil, región situada en la zona dorsal del bulbo raquídeo bajo las crestas cerebelosas, se pueden diferenciar dos tipos neuronales relacionados con los nervios de la línea lateral: las *células de la cresta*, de aspecto fusiforme, y las *células ovals*, de menor tamaño (Díaz Regueira y Anadón, 1989, 1995). Estas neuronas son inmunonegativas a la carnosina, pero aparecen cubiertas de numerosos botones sinápticos Car-ir. Los terminales sinápticos inmunomarcados también se observan sobre las dendritas apicales de las células de la cresta que se introducen y ramifican en las crestas cerebelosas (Figs. 7Ñ, 27B).

Los núcleos reticulares contienen neuronas que en su mayor parte son inmunorreactivas a la carnosina. A nivel del núcleo anterior del V y en posición ventral a éste, se encuentra la porción bulbar del núcleo reticular superior, formado por grandes neuronas (30x50 μm) de aspecto piriforme (Figs. 7L, 26D). El núcleo reticular medial (Figs. 7L, 27C, D), localizado a nivel de la entrada del nervio facial, está formado por neuronas también de gran tamaño (25x40 μm) de aspecto fusiforme.

La región caudal de la columna viscerosensorial contiene una abundante población de células carnosina inmunorreactivas, que se extienden desde la región rostral del obex hacia el núcleo comisural de Cajal, en la región próxima al área postrema. Se corresponden con células pequeñas de soma redondeado y que se encuentran densamente agrupadas en zonas mediales y ventrales (Figs. 7O, 27E).

CARNOSINA Y/O DIPÉPTIDOS RELACIONADOS EN CÉLULAS GLIALES EN EL ENCÉFALO DEL MÚGIL ADULTO

La carnosina, además de localizarse en neuronas de diferentes regiones encefálicas,

también se localiza en células inmunonegativas para el marcador neuronal HuC/D, correspondiéndose éstas con células gliales.

Una población glial específica que expresa carnosina en diferentes porciones encefálicas es la compuesta por las células endimarias que recubren los ventrículos de las porciones telencefálicas, diencefálicas y mesencefálicas. Así en el ventrículo telencefálico pueden observarse células Car-ir localizadas en la capa endimaria (Figs. 7D, 28A). Éstas presentan inmunorreactividad a la carnosina incluso en sus prolongaciones celulares, orientadas en dirección contraria al ventrículo. En ciertas porciones diencefálicas, también resultaron Car-ir endimocitos que revisten el tercer ventrículo, así como sus procesos celulares (Figs. 7F, 28D). En porciones mesencefálicas, localizados dorsales al núcleo del nervio troclear, se observaron endimocitos y procesos Car-ir revistiendo el cuarto ventrículo (Figs. 7J, 20F).

También se observaron células gliales en la capa subendimaria de regiones telencefálicas, localizadas próximas al núcleo ventral del área ventral telencefálica (Vv) (Figs. 7D, 10A), y diencefálicas, próximas a los núcleos dorsomedial y ventromedial talámicos, además de en zonas laterales a las habénulas (Figs. 7F, 12A, C, D, F, 28E).

Asimismo, se observaron células gliales Car-ir agrupadas en zonas que se podrían considerar subendimarias a nivel de la comisura posterior en regiones ventrales y dorsales de dicha comisura (Figs. 7G, H, 19A, C, 28F).

En el nervio óptico, se observó la presencia de células gliales que se podrían corresponder con astrocitos reticulares, los cuales son de pequeño tamaño con numerosas prolongaciones que les dan un aspecto estrellado (Figs. 7D, 28B, C). Asimismo dentro del nervio óptico se observó la presencia células de muy pequeño tamaño que no presentan prolongaciones y podrían corresponderse con células de la microglía (Figs. 7D, 28C)

Además, se observó la presencia de algunas células gliales Car-ir en la gruesa región glial (Arochena y col., 2004) que, en el techo óptico del mágil se localiza entre el estrato periventricular del techo óptico y el ventrículo (Figs. 7I, J, 16A, C, 28G, H). Estas células presentan un soma redondeado con un tamaño aproximado a los 10 μ m de diámetro, con procesos también Car-ir (Figs. 7I, 16 D, 28 G, H).

Abreviaturas

BO	Bulbo olfatorio	NI	núcleo del istmo
CA	comisura anterior	Nip	núcleo intermeduncular
CC	cuerpo cerebeloso	NLT	núcleo tuberal lateral
CGL	capa ganglionar cerebelosa	NLV	núcleo lateral de la válvula
CGr	capa granular cerebelosa	NmesV	núcleo mesencefálico del nervio trigémino
CH	comisura horizontal	NO	nervio óptico
CM	capa molecular cerebelosa	NTA	núcleo tuberal anterior
CN	núcleo central de los lóbulos hipotalámicos inferiores	nV	nervio trigémino
Co	núcleo cortical	PA	núcleo paracomisural
CP	comisura posterior	PG	núcleo pregglomeruloso
Cr	cresta cerebelosa	pPO	núcleo preóptico parvocelular
Cvs	columna viscerosensorial	PSP	núcleo pretectal superficial parvocelular
Dc	zona central del área dorsal telencefálica	QO	quiasma óptico
Dd	zona dorsal del área dorsal telencefálica	rl	receso lateral hipotalámico
Dld	parte dorsal de la zona lateral del área dorsal telencefálica	SAC	estrato blanco central del techo óptico
Dlp	parte posterior de la zona lateral del área dorsal telencefálica	SFGS	estrato fibroso y gris superficial del techo óptico
Dlv	parte ventral de la zona lateral del área dorsal telencefálica	SGC	estrato gris central del techo óptico
Dm	zona medial del área dorsal telencefálica	SM	estrato marginal del techo óptico
Dp	zona posterior del área dorsal telencefálica	SO	estrato óptico del techo óptico
DT	núcleo talámico dorsomedial	SP	estrato periventricular del techo óptico
E	núcleo entopeduncular	SR	núcleo superior del rafe
flm	fascículo longitudinal medial	sV	núcleo sensorial del nervio trigémino
FR	formación reticular	SV	saco vasculoso
fl	fascículo telencefálico lateral	TE	telencéfalo
GC	gris central	TL	toro longitudinal
GR	núcleo glomeruloso	TO	techo óptico
GRa	núcleo glomeruloso parte anterior	TrO	tracto óptico
H	hipófisis	TS	toro semicircular
Ha	habénula	Vc	núcleo central del área ventral telencefálica
III	núcleo oculomotor	Vd	núcleo dorsal del área ventral telencefálica
IV	núcleo troclear	Vi	núcleo intermedio del área ventral telencefálica
IXm	núcleo motor glosofaríngeo	Vic	núcleo abducente, parte caudal
LC	<i>locus coeruleus</i>	VIII _m	núcleo octavo magnocelular
LHI	lóbulo hipotalámico inferior	VIII _t	núcleo octavo tangencial
MO	<i>médulla oblongata</i>	VII _m	núcleo motor facial
mPO	núcleo preóptico magnocelular	VI _r	núcleo abducente, parte rostral
mV	núcleo motor del trigémino	VI	núcleo lateral del área ventral telencefálica
Nflm	núcleo del fascículo longitudinal medial	Vs	núcleo supracomisural del área ventral telencefálica
NGS	núcleo gustatorio secundario	VT	núcleo talámico ventromedial
		Vv	núcleo ventral del área ventral telencefálica
		Xm	núcleo motor del vago

Fig. 7: Representación esquemática de secciones transversales a través del encéfalo adulto del mágil (*Chelon labrosus* R.), mostrando en la parte derecha de cada esquema el patrón de distribución de neuronas (puntos gruesos), fibras (líneas), y células de la glía (estrellas) inmunorreactivas a la Carnosina (**B-O**), y en la parte izquierda el nivel encefálico (núcleo/región) correspondiente. En **A** se señala el nivel de dichas secciones. Barra de escala: 600 μm (**A**), 200 μm (**B-O**).

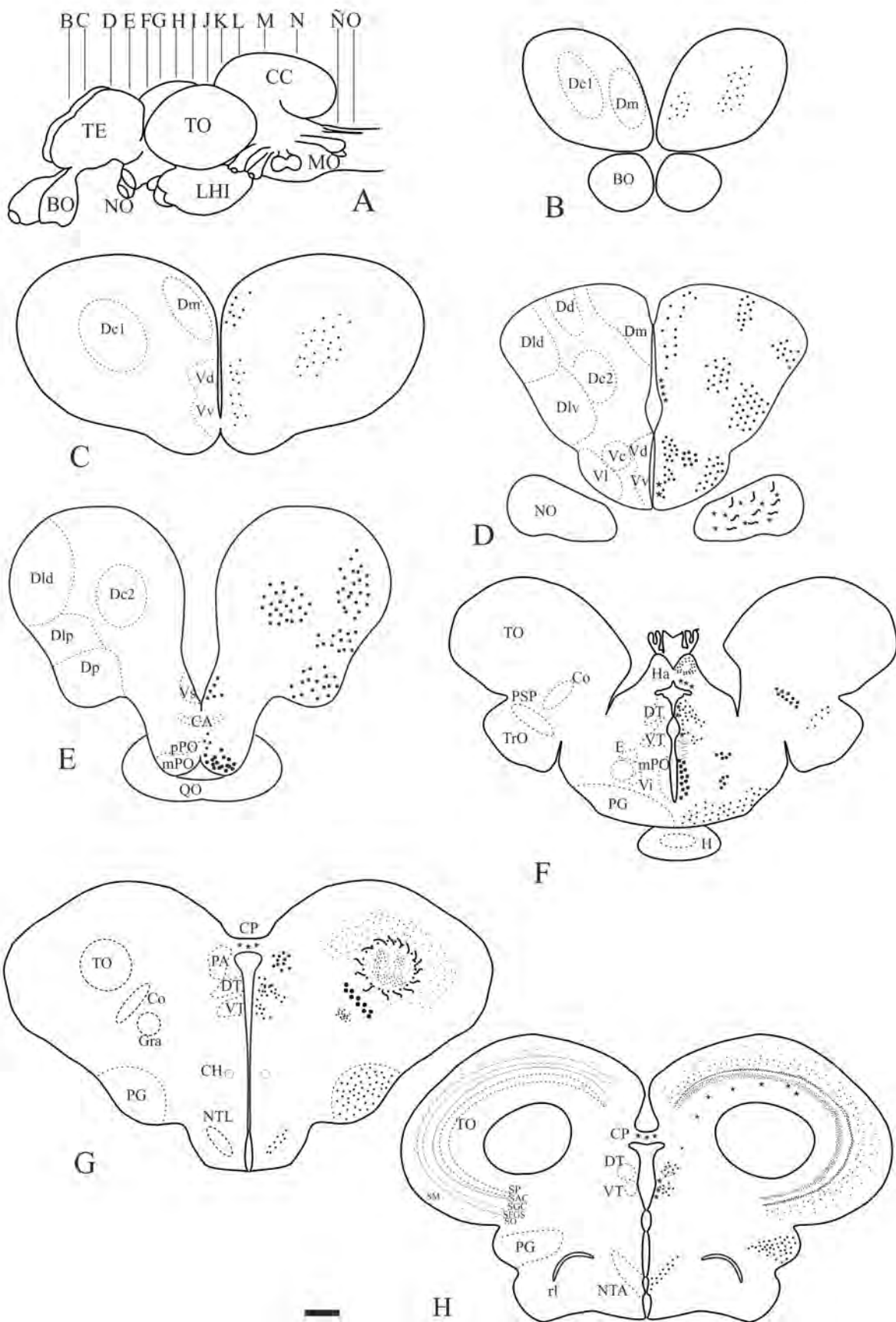


Fig. 7 (continuación): Representación esquemática de secciones transversales a través del encéfalo adulto del mágil (*Chelon labrosus* R.), mostrando en la parte derecha de cada esquema el patrón de distribución de neuronas (puntos gruesos), fibras (líneas), y células de la glía (estrellas) inmunorreactivas a la Carnosina (**B-O**), y en la parte izquierda el nivel encefálico (núcleo/región) correspondiente. En **A** se señala el nivel de dichas secciones. Barra de escala: 600 μm (**A**), 200 μm (**B-O**).

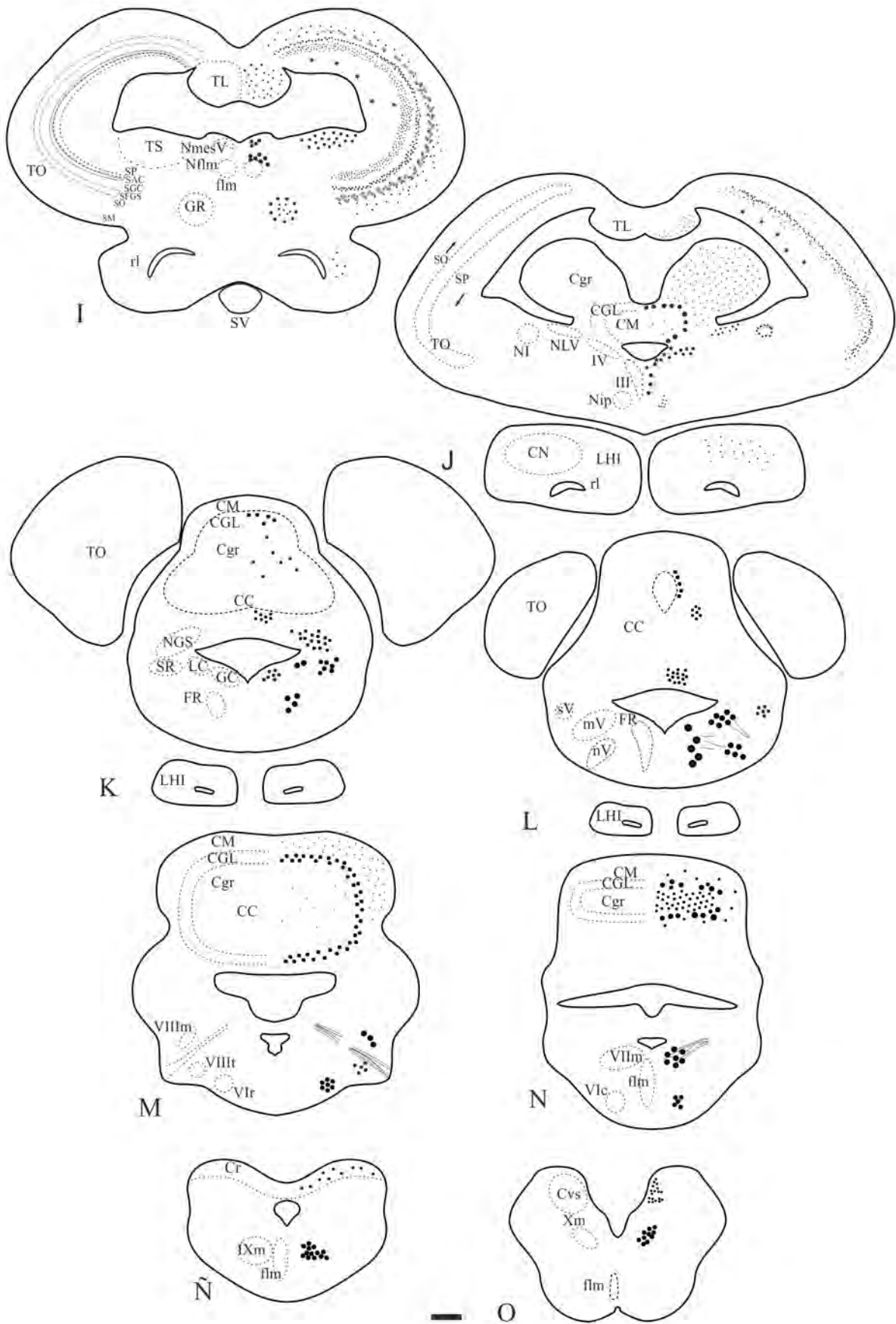


Fig. 8: Microfotografías de confocal de secciones transversales a través del telencéfalo dorsal del mágil convertidas a escala de grises e invertidas como positivas. Neuronas Car-ir (flechas). **A**, subdivisión rostral de la zona central (Dc1). **B**, subdivisión caudal de la zona central (Dc2). **C**, zona medial (Dm), señalándose el límite con Dc1. **D**, zona dorsal (Dd). **E**, subdivisión dorsal de la zona lateral (Dld). **F**, subdivisiones dorsal (Dld) y ventral (Dlv) de la zona lateral. Barras de escala = 50 μm (**A**, **B**, **C**, **D**, **F**), 20 μm (**E**).

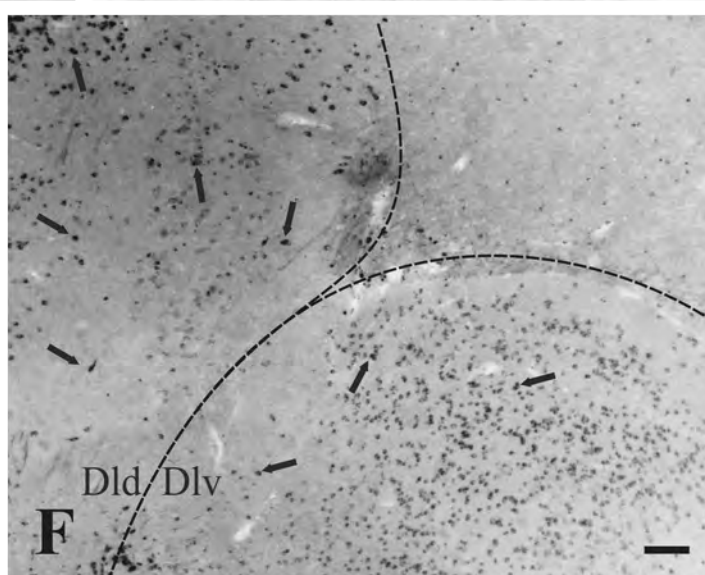
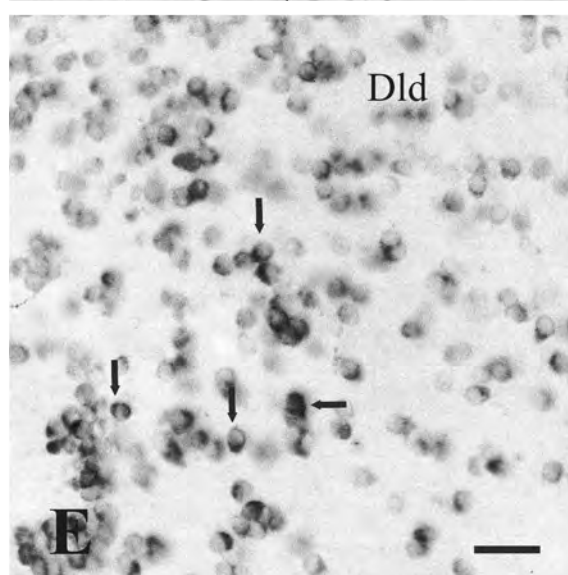
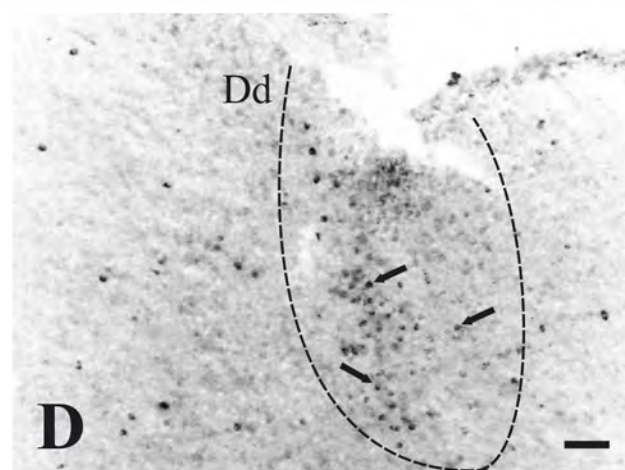
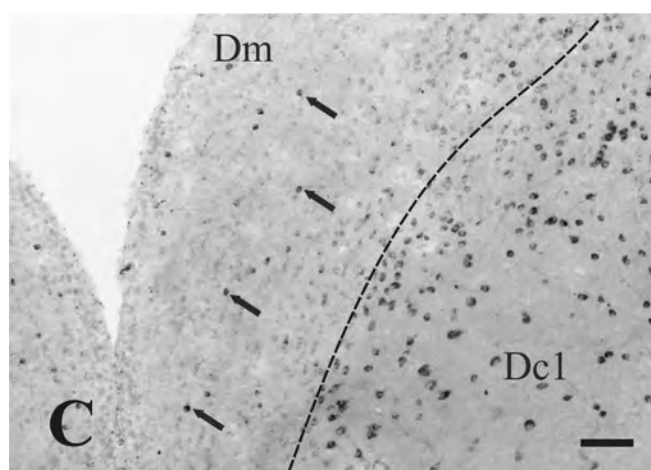
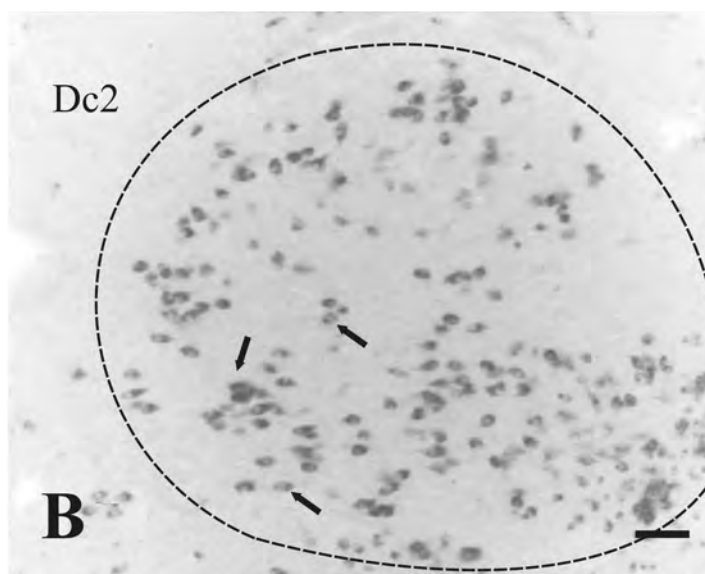
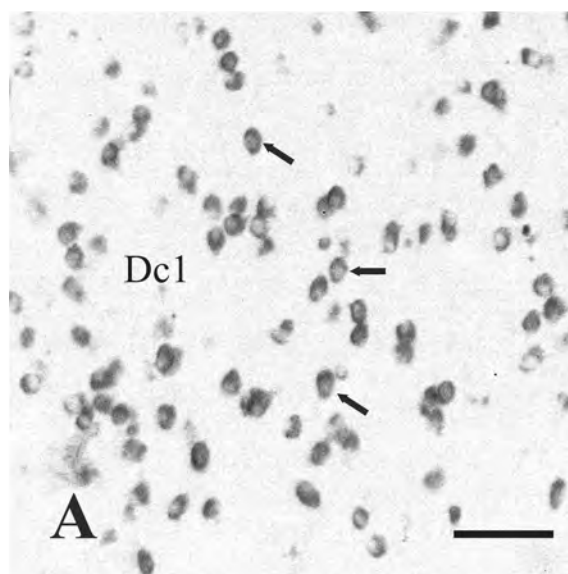


Fig. 9: Microfotografías de confocal de secciones transversales a través del telencéfalo dorsal del múgil, convertidas a escala de grises e invertidas como positivas (**A, D, E, F**). Neuronas Car-ir (flechas). **A**, detalle (ver Fig. 8E) de neuronas Car-ir en la subdivisión dorsal de la zona lateral (Dld). **B**, porción rostral de la subdivisión ventral de la zona lateral (Dlv). **C**, porción caudal de la subdivisión ventral de la zona lateral (Dlv). **D**, neuronas Car-ir en la subdivisión posterior de la zona lateral (Dlp), situadas dorsalmente a la zona posterior del telencéfalo dorsal (Dp). **E**, neuronas Car-ir de la zona posterior (Dp). **F**, detalle de las neuronas de la zona posterior (Dp) del telencéfalo dorsal. Barras de escala = 25 μm (**F**), 50 μm (**A, D, E**), 100 μm (**B, C**).

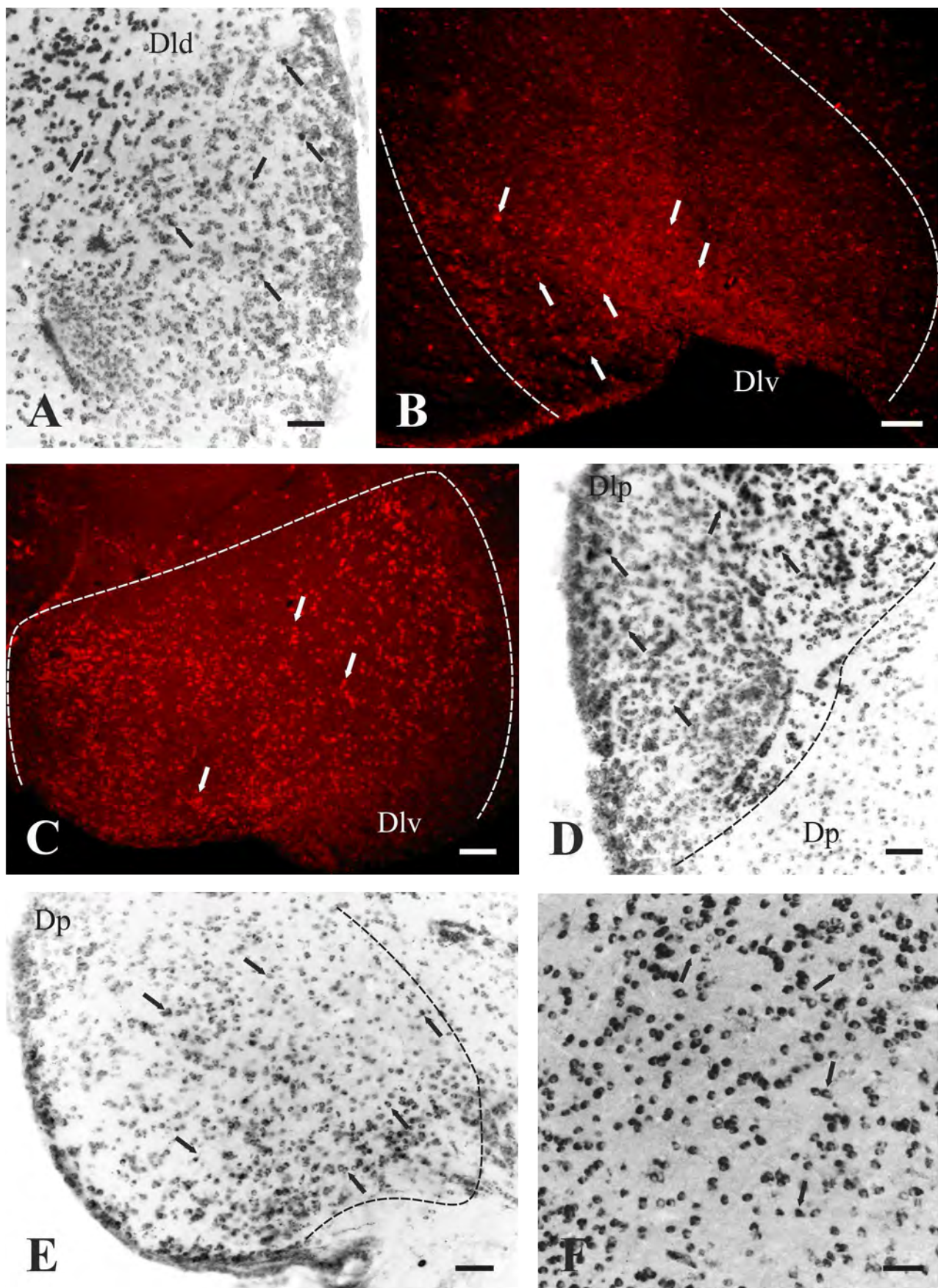


Fig. 10: Microfotografías de confocal de secciones transversales a través del telencéfalo ventral del mágil, convertidas a escala de grises e invertidas como positivas (**B, D, E, F**). Neuronas Car-ir (flechas), células gliales (cabezas de flecha), ventrículo telencefálico (asterisco). **A**, telencéfalo ventral a nivel de los núcleos dorsal (Vd) y ventral (Vv) mostrando colocalización de carnosina (canal magenta) y HuC/D (canal verde) en neuronas (flechas) de ambos núcleos, obsérvese asimismo células gliales subependimarias próximas al núcleo ventral del telencéfalo ventral (cabezas de flecha) sólo inmunorreactivas a la carnosina. **B**, detalle de las células Car-ir de los núcleos dorsal y ventral del telencéfalo ventral. **C**, núcleo lateral del telencéfalo ventral (Vl). **D**, núcleo supracomisural del telencéfalo ventral (Vs). **E**, núcleo central del telencéfalo ventral (Vc). **F**, neuronas Car-ir en el núcleo entopeduncular (E) y núcleo intermedio (Vi) del telencéfalo ventral, situados dorsal y ventrolateralmente, respectivamente, al fascículo telencefálico lateral (ftl). Barras de escala = 50 μm (**A, B, F**), 100 μm (**C, D, E**).

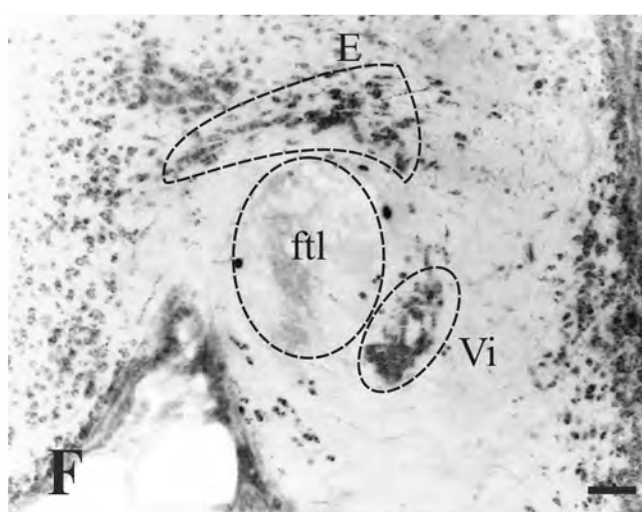
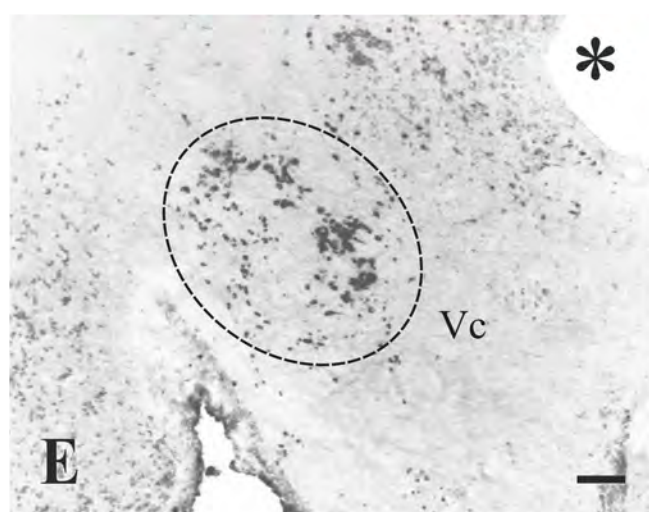
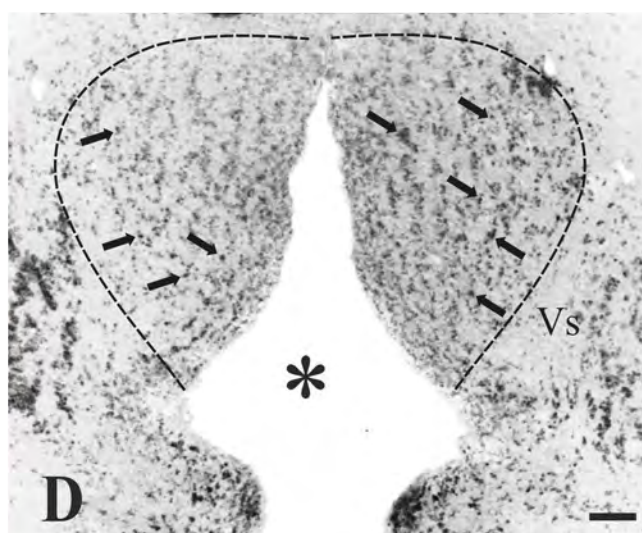
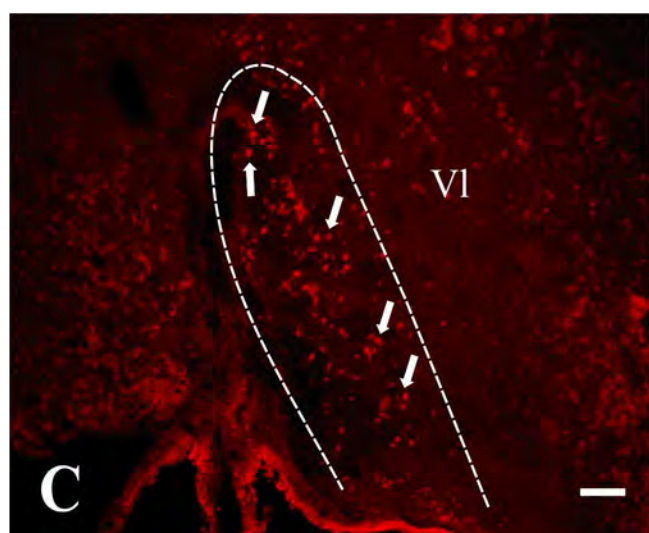
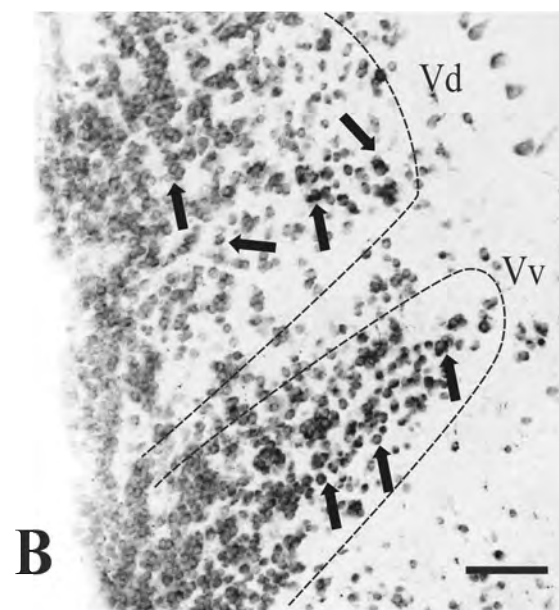
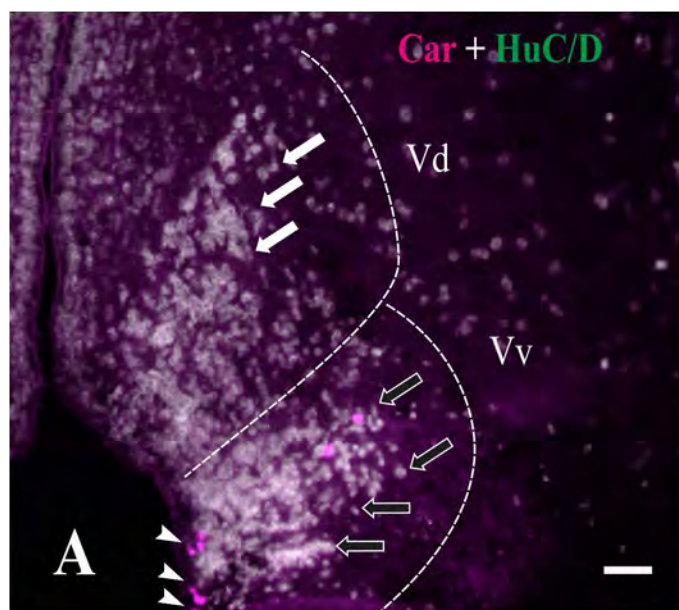


Fig. 11: Microfotografías de confocal de secciones transversales correspondientes a la región preóptica, hipotálamo y tubérculo posterior del mágil convertidas a escala de grises e invertidas como positivas. Neuronas Car-ir (flechas y cabezas de flecha). **A**, región preóptica mostrando neuronas Car-ir en el núcleo preóptico magnocelular (flechas) y parvocelular (cabezas de flecha). Asterisco (receso preóptico). **B**, detalle de las neuronas del núcleo preóptico magnocelular. **C**, núcleo preglomeruloso. **D**, porción del núcleo glomeruloso mostrando neuronas medianas Car-ir en el borde (flechas), y neuronas de menor tamaño en la parte central (cabezas de flecha). **E**, detalle de microfotografía D, mostrando neuronas medianas (flechas), y neuronas pequeñas (cabeza de flecha) del núcleo glomeruloso. **F**, porción hipotalámica media donde se pueden observar neuronas Car-ir muy numerosas y de pequeño tamaño en las proximidades del receso infundibular (asterisco) que se extienden lateralmente en el núcleo del receso lateral. Barras de escala = 20 μm (**B**, **E**), 50 μm (**D**), 100 μm (**A**, **C**, **F**).

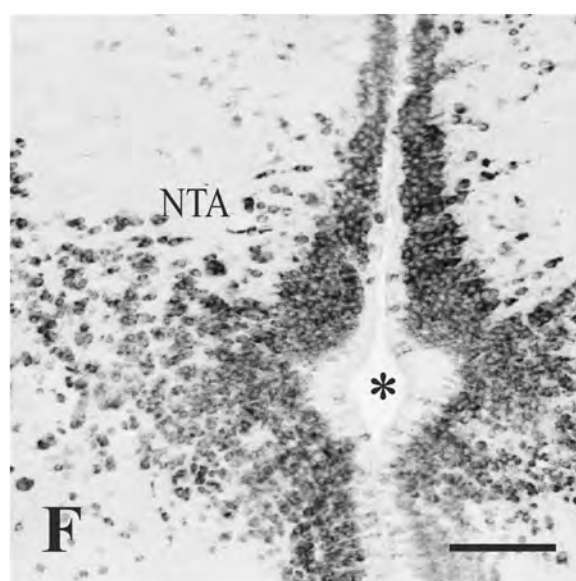
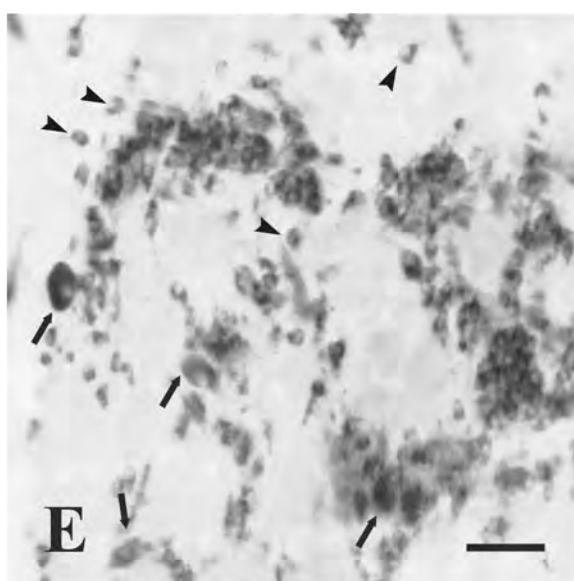
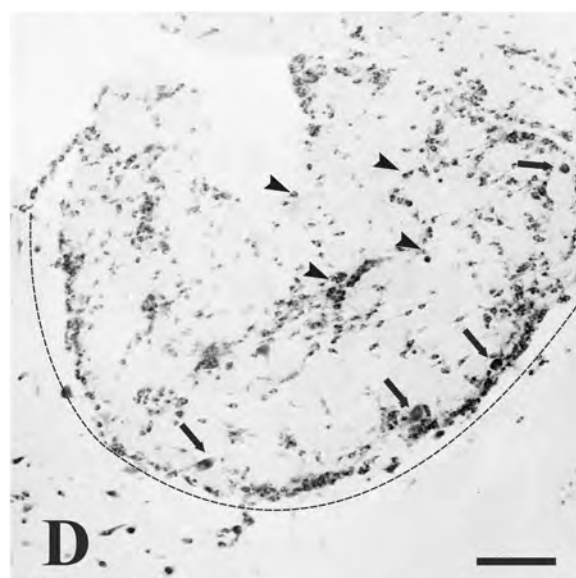
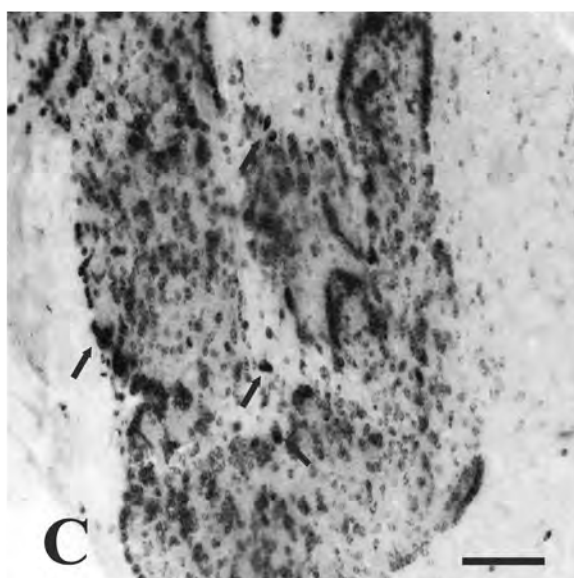
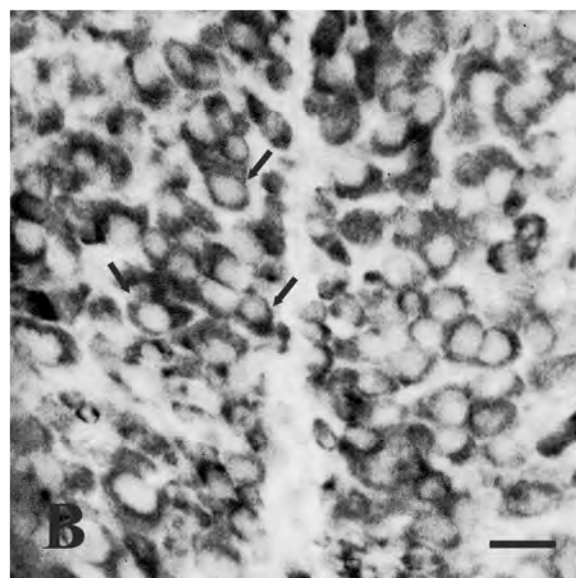
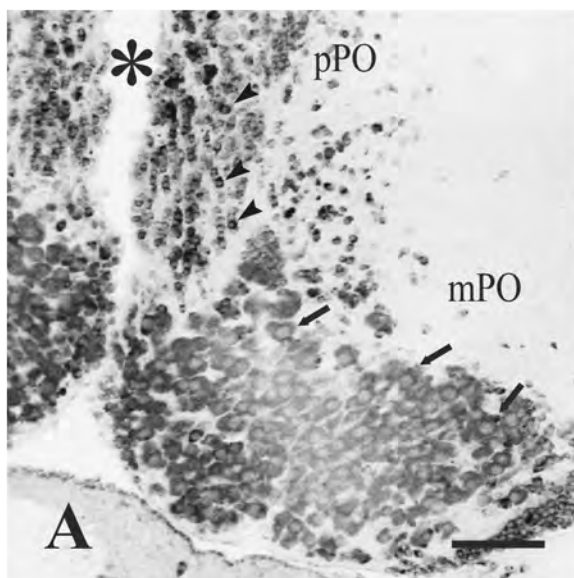


Fig. 12: Microfotografías de confocal de secciones transversales a nivel de las regiones del tálamo (**A, B, C**), epitálamo (**D, E, F, G**) y pretecho (**H**) del mágil, mostrando inmunorreactividad a la carnosina (**A, D, G, H**), inmunorreactividad a la HuC/D (**B, E**), y colocalización Car + HuC/D (**C, F**) y de campo claro (**G, H**). **A, B, C**, neuronas de los núcleos talámicos dorsomedial (flechas blancas) y ventromedial (cabezas de flecha blancas), nótese igualmente la presencia de células gliales Car-ir (cabezas de flecha negras) localizadas en el estrato subependimario (**A, C**). Obsérvese la presencia de neuronas Car-ir en el núcleo de la comisura posterior (flechas negras). **D, E, F**, habénula del epitámo, donde se pueden observar cordones de pequeñas neuronas intensamente Car-ir (**D, F**) en regiones intermedias, y neuronas levemente Car-ir en la zona ventral (**D, F**). Las flechas señalan neuronas Car-ir (**D, F**), neuronas HuC/D-ir (**E**) y el asterisco el tercer ventrículo. **G**, porción rostral del epitálamo mostrando la habénula con neuronas Car-ir (flechas), y fibras Car-ir (cabezas de flecha). **H**, porción del pretecho mostrando neuronas Car-ir en el núcleo pretectal superficial parvocelular. Barras de escala = 30 μm (**G**), 50 μm (**A, B, C, H**), 100 μm (**D, E, F**).

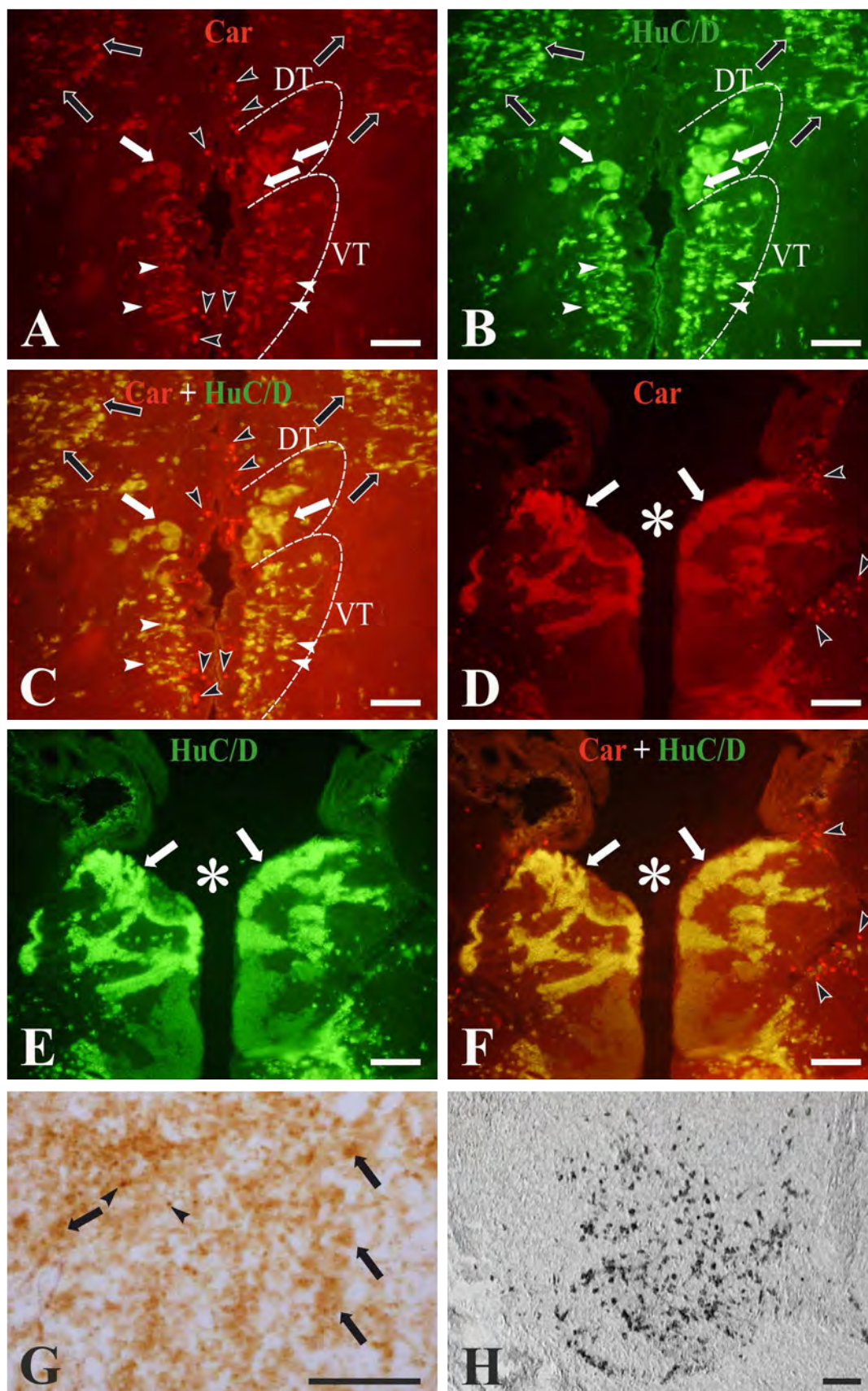


Fig. 12*: Microfotografías de confocal de secciones transversales a nivel de las regiones del tálamo (**A, B, C**), epitálamo (**D, E, F, G**) y pretecho (**H**) del mágil, mostrando inmunorreactividad a la carnosina (**A, D, G, H**), inmunorreactividad a la HuC/D (**B, E**), y colocalización Car + HuC/D (**C, F**) y de campo claro (**G, H**). **A, B, C**, neuronas de los núcleos talámicos dorsomedial (flechas blancas) y ventromedial (cabezas de flecha blancas), nótese igualmente la presencia de células gliales Car-ir (cabezas de flecha negras) localizadas en el estrato subependimario (**A, C**). Obsérvese la presencia de neuronas Car-ir en el núcleo de la comisura posterior (flechas negras). **D, E, F**, habénula del epitálamo, donde se pueden observar cordones de pequeñas neuronas intensamente Car-ir (**D, F**) en regiones intermedias, y neuronas levemente Car-ir en la zona ventral (**D, F**). Las flechas señalan neuronas Car-ir (**D, F**), neuronas HuC/D-ir (**E**) y el asterisco el tercer ventrículo. **G**, porción rostral del epitálamo mostrando la habénula con neuronas Car-ir (flechas), y fibras Car-ir (cabezas de flecha). **H**, porción del pretecho mostrando neuronas Car-ir en el núcleo pretectal superficial parvocelular. Barras de escala = 30 μm (**G**), 50 μm (**A, B, C, H**), 100 μm (**D, E, F**).

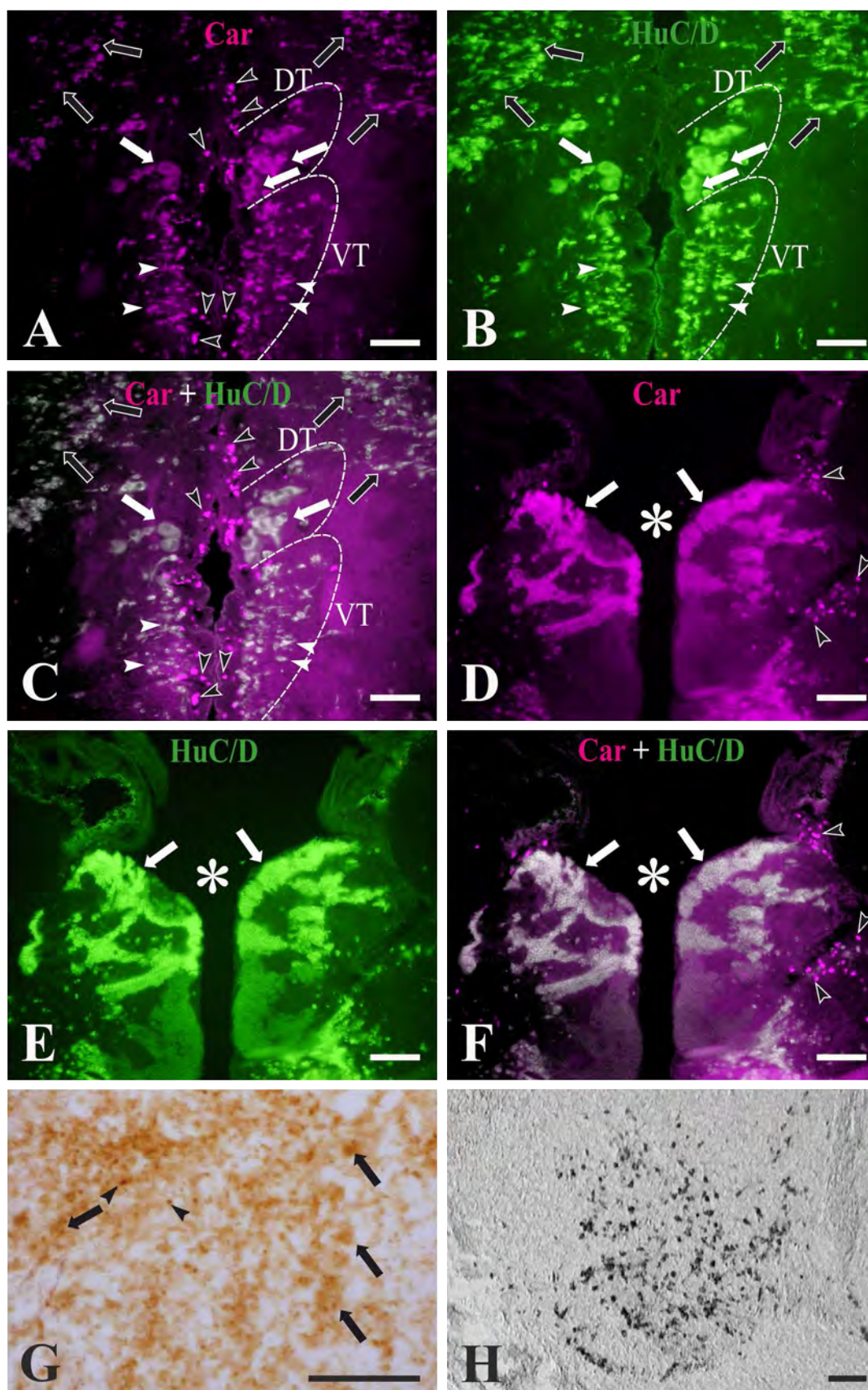


Fig. 13: Microfotografías de confocal de secciones transversales a nivel del techo óptico del mágil mostrando inmunofluorescencia a la carnosina (**A**), HuC/D (**B**) y colocalización de ambas sustancias (**C**). **A, B, C**, neuronas Car-ir y HuC/D-ir (cabezas de flecha negras) del estrato periventricular (SP), neuronas Car-ir y HuC/D-ir (flechas blancas) del estrato blanco central (SAC), neuronas Car-ir y HuC/D-ir (cabezas de flecha blancas) del estrato gris central (SGC), y células gliales (flechas negras) de la región glial subventricular bajo el estrato periventricular. Barras de escala = 150 μm .

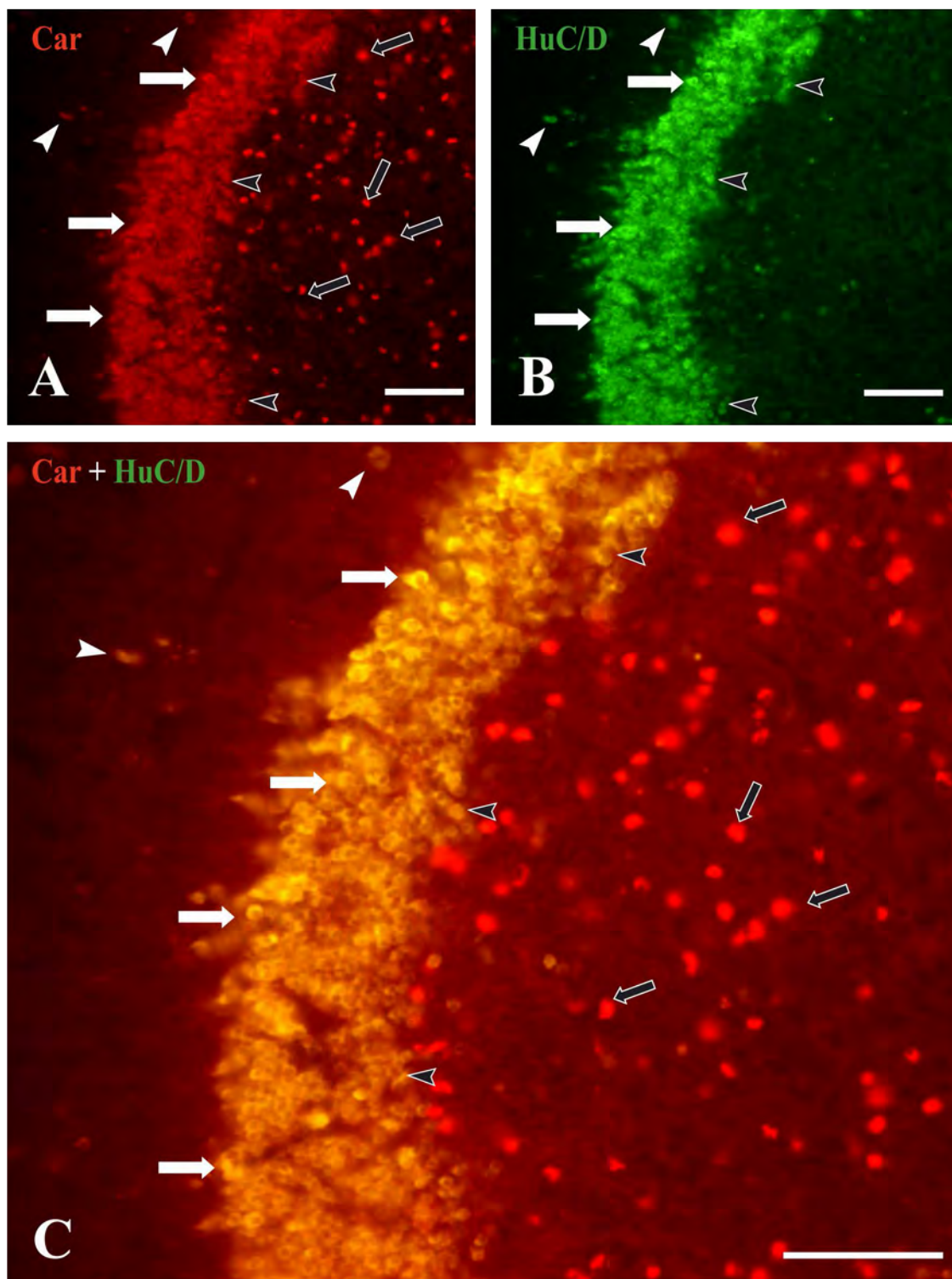


Fig. 13*: Microfotografías de confocal de secciones transversales a nivel del techo óptico del mágil mostrando inmunofluorescencia a la carnosina (**A**), HuC/D (**B**) y colocalización de ambas sustancias (**C**). **A, B, C**, neuronas Car-ir y HuC/D-ir (cabezas de flecha negras) del estrato periventricular (SP), neuronas Car-ir y HuC/D-ir (flechas blancas) del estrato blanco central (SAC), neuronas Car-ir y HuC/D-ir (cabezas de flecha blancas) del estrato gris central (SGC), y células gliales (flechas negras) de la región glial subventricular bajo el estrato periventricular. Barras de escala = 150 μm .

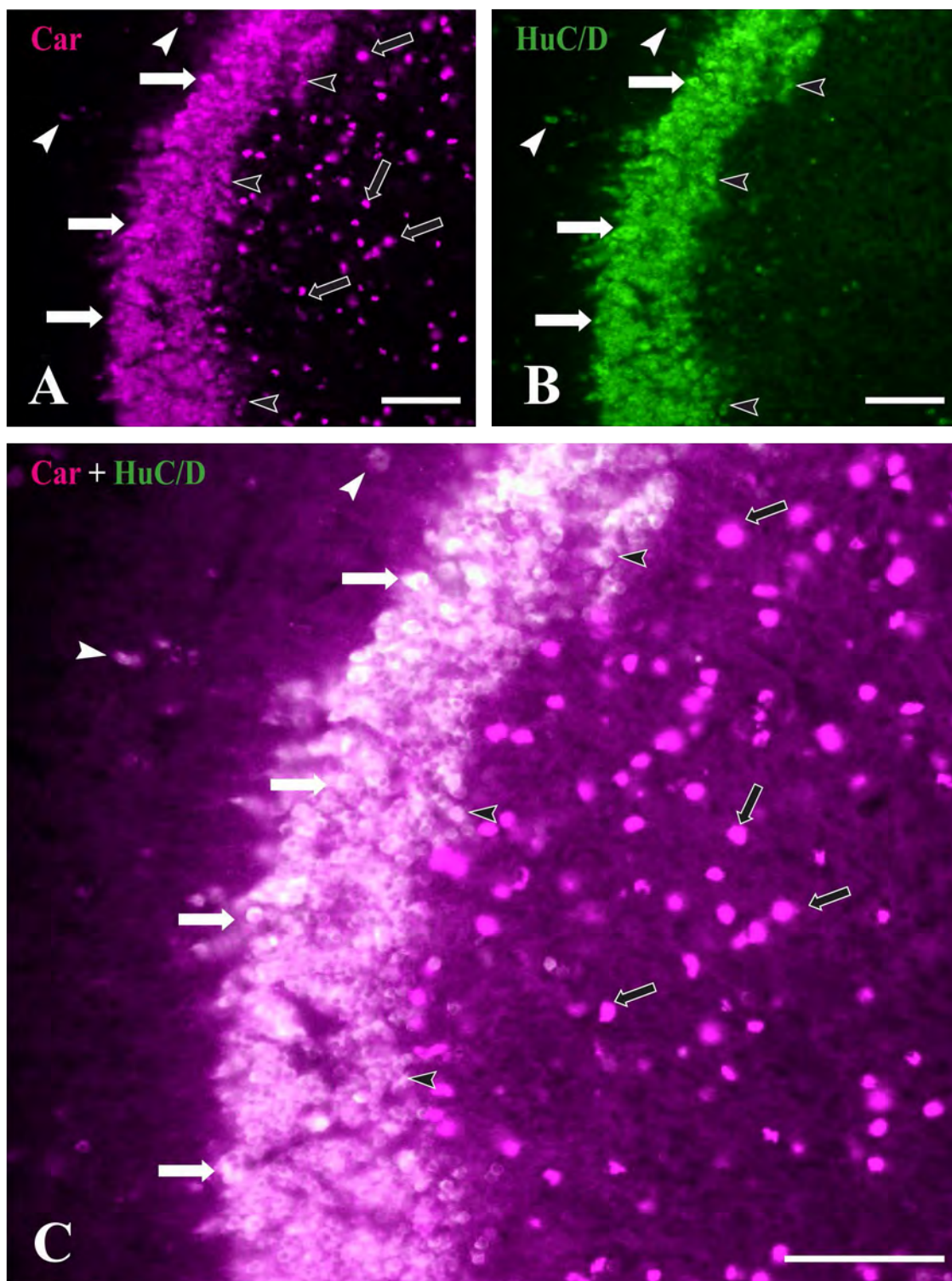


Fig. 14: Microfotografías de confocal de secciones transversales del techo óptico del mágil mostrando inmunofluorescencia a la carnosina (**A**), HuC/D (**B**) y colocalización de ambas sustancias (**C**). **A, B, C**, neuronas inmunorreactivas en el estrato blanco central (flechas) del techo óptico (SAC, tipo XIII), las cabezas de flecha blancas señalan neuronas en el estrato gris central (SGC, tipo XII), en el estrato fibroso y gris superficial (SFGS) y en el estrato óptico (SO, tipo III). Cabezas de flechas negras en SGC señalan neuronas tipo X. Barras de escala = 150 μm .

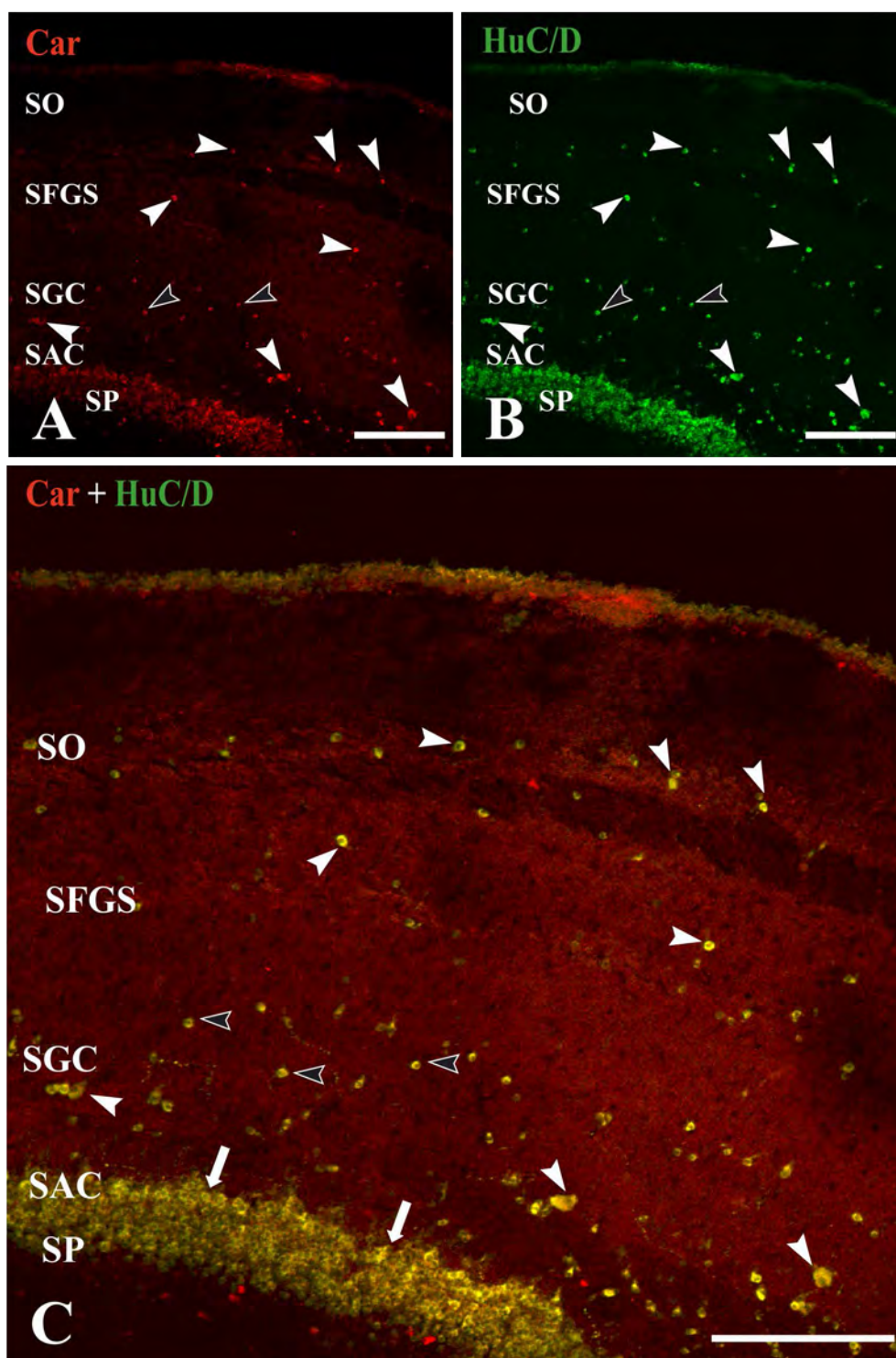


Fig. 14*: Microfotografías de confocal de secciones transversales del techo óptico del mágil mostrando inmunofluorescencia a la carnosina (**A**), HuC/D (**B**) y colocalización de ambas sustancias (**C**). **A, B, C**, neuronas inmunorreactivas en el estrato blanco central (flechas) del techo óptico (SAC, tipo XIII), las cabezas de flecha blancas señalan neuronas en el estrato gris central (SGC, tipo XII), en el estrato fibroso y gris superficial (SFGS) y en el estrato óptico (SO, tipo III). Cabezas de flechas negras en SGC señalan neuronas tipo X. Barras de escala = 150 μm .

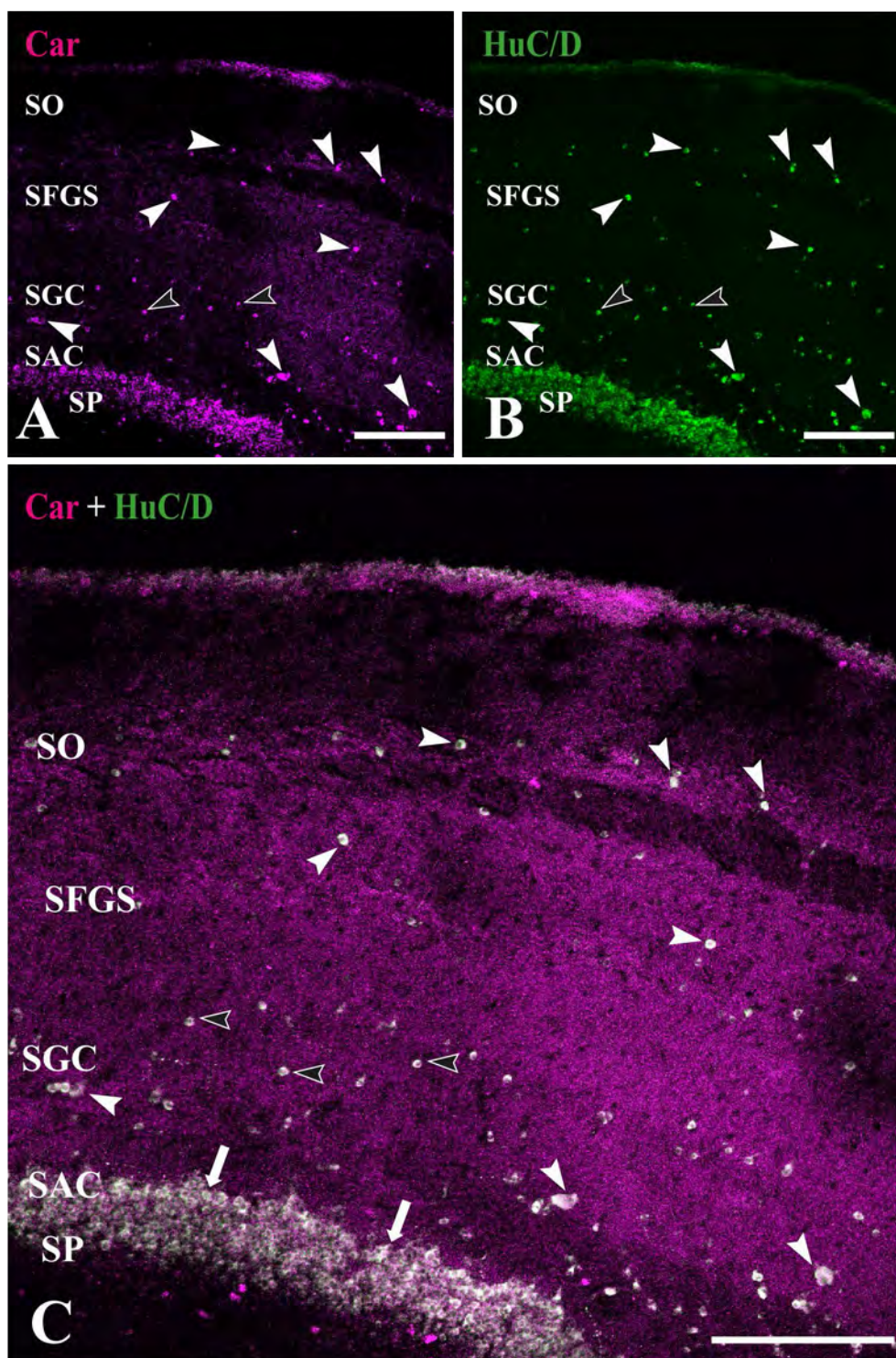


Fig. 15: Microfotografías de confocal de secciones transversales del techo óptico (caudal) del mágil mostrando inmunofluorescencia a la carnosina (**A**), HuC/D (**B**) y colocalización de ambas sustancias (**C**, **D**). **A**, **B**, **C**, **D**, haces de fibras Car-ir (cabezas de flecha) localizados en el estrato gris central (SGC) y estrato óptico (SO) con una orientación oblicua (**A**, **C**) y paralela (**D**) respecto al estrato blanco central (SAC). Barras de escala = 50 μm .

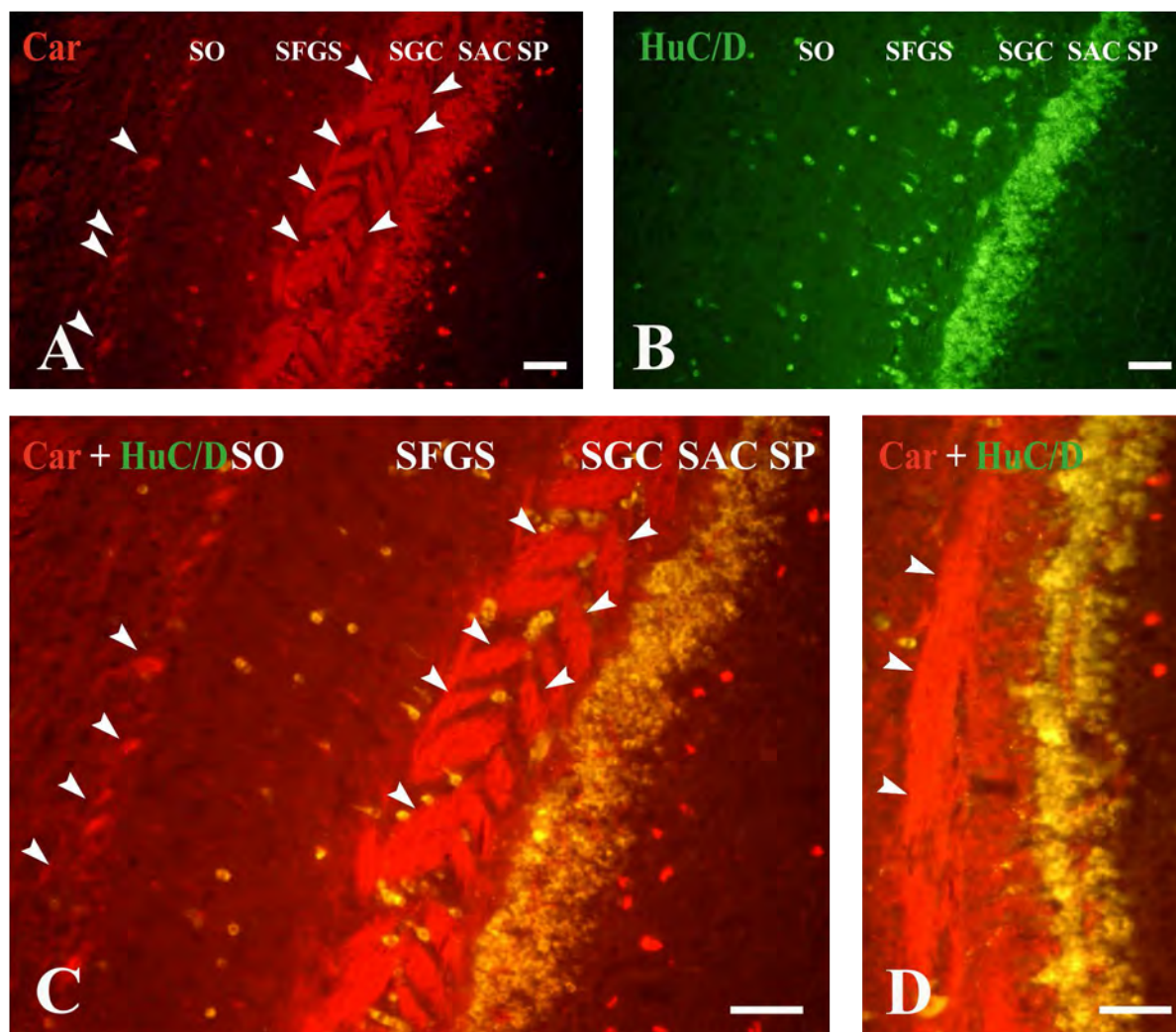


Fig. 15*: Microfotografías de confocal de secciones transversales del techo óptico (caudal) del mágil mostrando inmunofluorescencia a la carnosina (**A**), HuC/D (**B**) y colocalización de ambas sustancias (**C**, **D**). **A**, **B**, **C**, **D**, haces de fibras Car-ir (cabezas de flecha) localizados en el estrato gris central (SGC) y estrato óptico (SO) con una orientación oblicua (**A**, **C**) y paralela (**D**) respecto al estrato blanco central (SAC). Barras de escala = 50 μm .

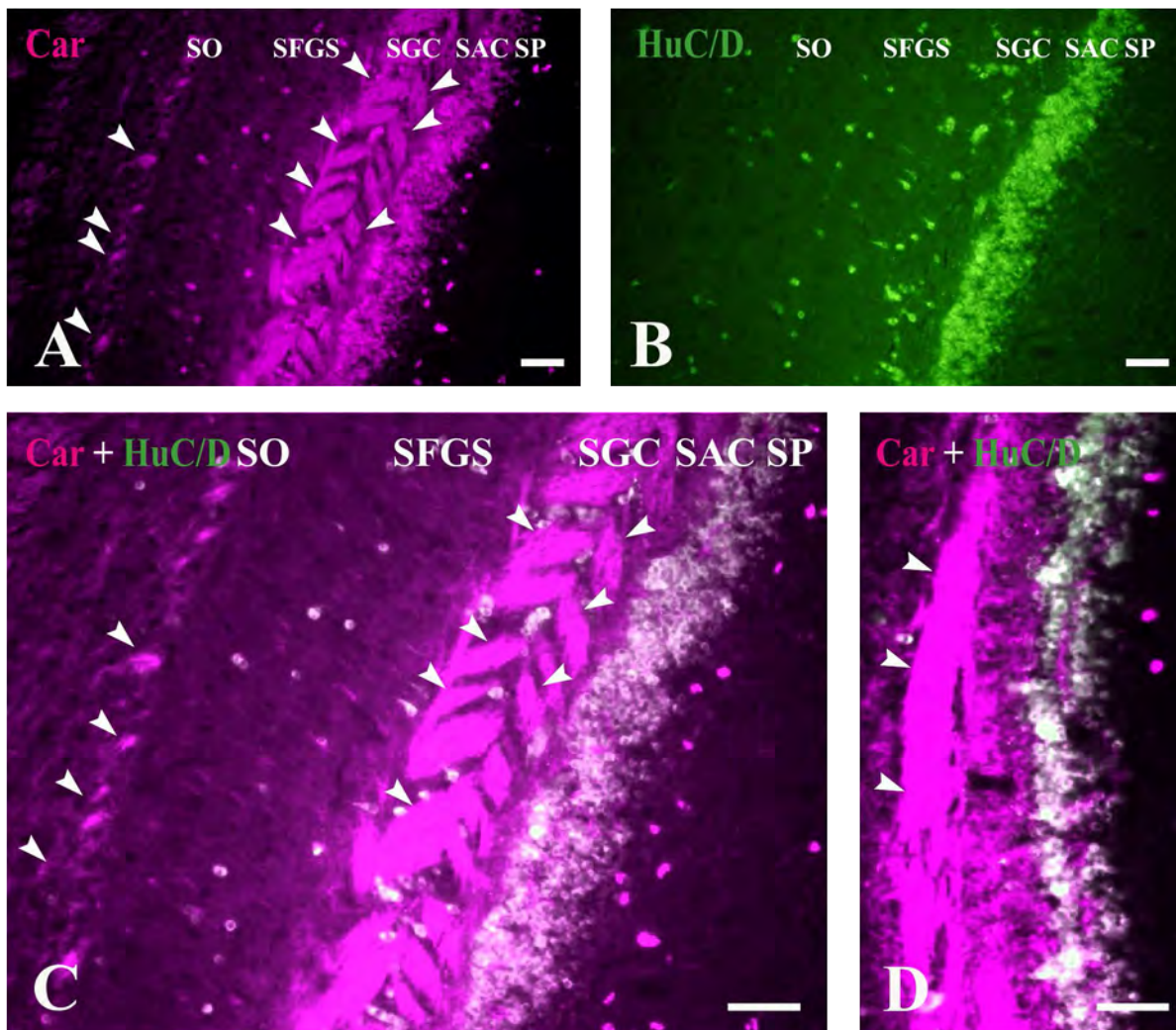


Fig. 16: Microfotografías de confocal (**A**, **B**, **C**, **E**) y de campo claro (**D**) de secciones transversales del techo óptico del mágil mostrando inmunofluorescencia a la carnosina (**A**, **C**, **E**), HuC/D (**B**) y colocación de ambas sustancias (**C**), convertida a escala de grises e invertida como positiva (**E**). **A**, **B**, **C**, región glial subventricular, donde se puede observar que las células presentes en esta región sólo presentan inmunorreactividad a la carnosina, y no para la HuC/D, dada su naturaleza glial. **D**, fibras Car-ir de la región subventricular (cabezas de flecha). **E**, células gliales Car-ir de la región subventricular (flechas). Barras de escala 30 μm (**E**, **F**), 50 μm (**A**, **B**, **C**, **D**).

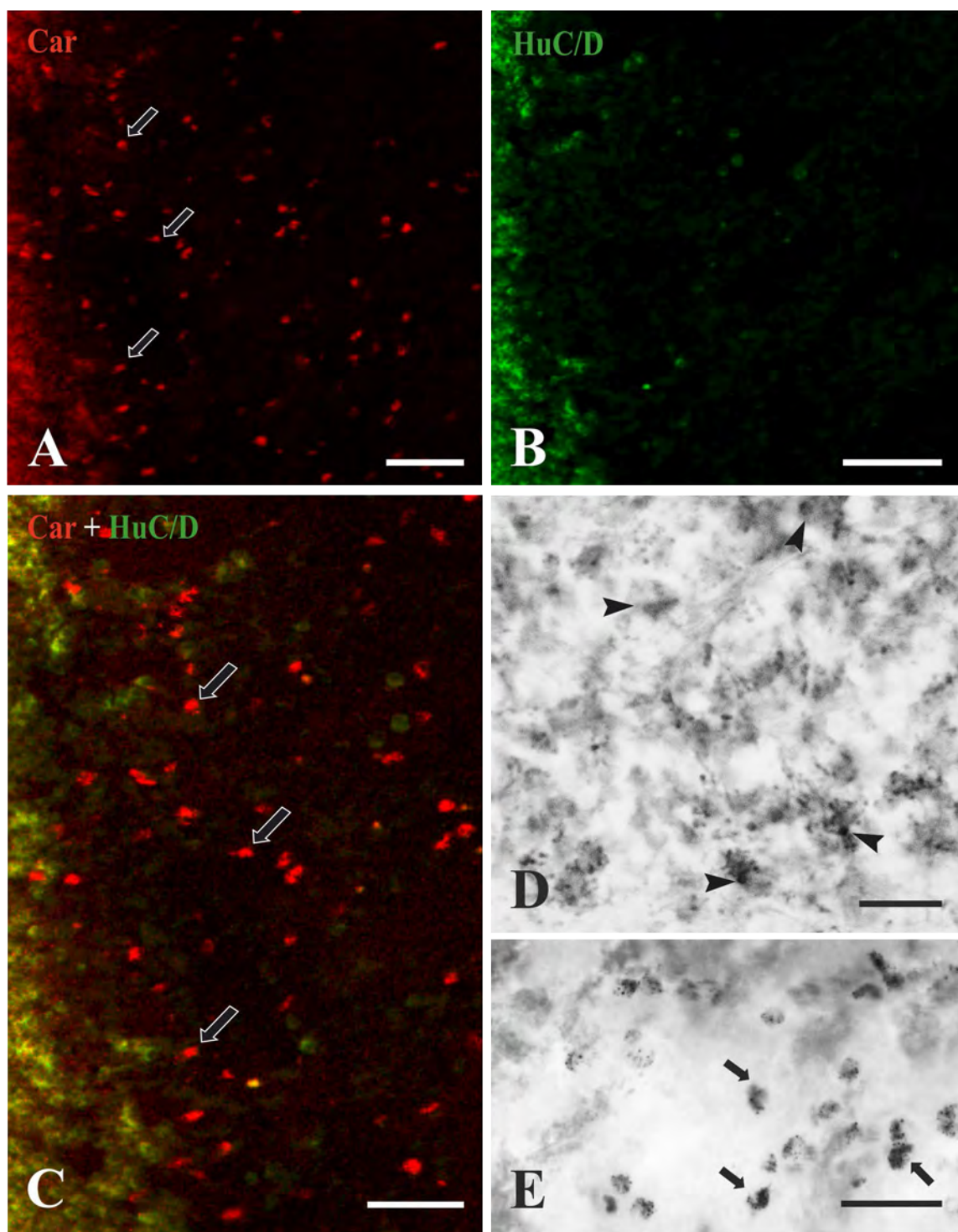


Fig. 16*: Microfotografías de confocal (**A**, **B**, **C**, **E**) y de campo claro (**D**) de secciones transversales del techo óptico del mágil mostrando inmunofluorescencia a la carnosina (**A**, **C**, **E**), HuC/D (**B**) y colocación de ambas sustancias (**C**), convertida a escala de grises e invertida como positiva (**E**). **A**, **B**, **C**, región glial subventricular, donde se puede observar que las células presentes en esta región sólo presentan inmunorreactividad a la carnosina, y no para la HuC/D, dada su naturaleza glial. **D**, fibras Car-ir de la región subventricular (cabezas de flecha). **E**, células gliales Car-ir de la región subventricular (flechas). Barras de escala 30 μm (**E**, **F**), 50 μm (**A**, **B**, **C**, **D**).

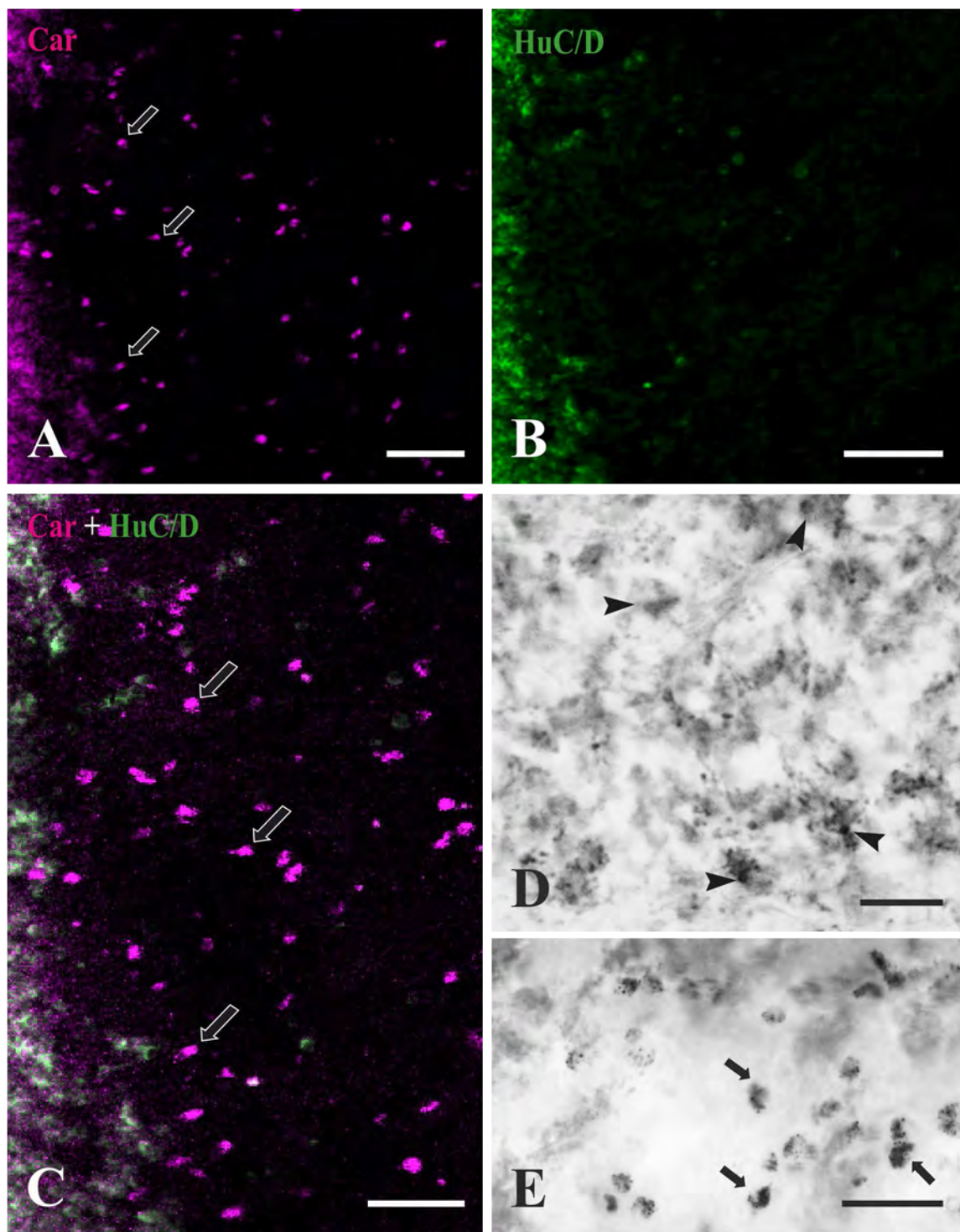


Fig. 17: Microfotografías de confocal de secciones transversales del techo óptico del mágil en la región del núcleo cortical (Co) mostrando inmunofluorescencia a la carnosina (**A**), HuC/D (**B**) y colocación de ambas sustancias (**C**). **A, B, C**, neuronas inmunorreactivas de gran tamaño en el núcleo cortical formando una lámina en el límite entre el techo óptico (dorsal, TO) y el pretecho, así como en el núcleo glomerular anterior (Gra), situado ventrolateralmente con respecto al núcleo cortical. Barras de escala = 50 μm .

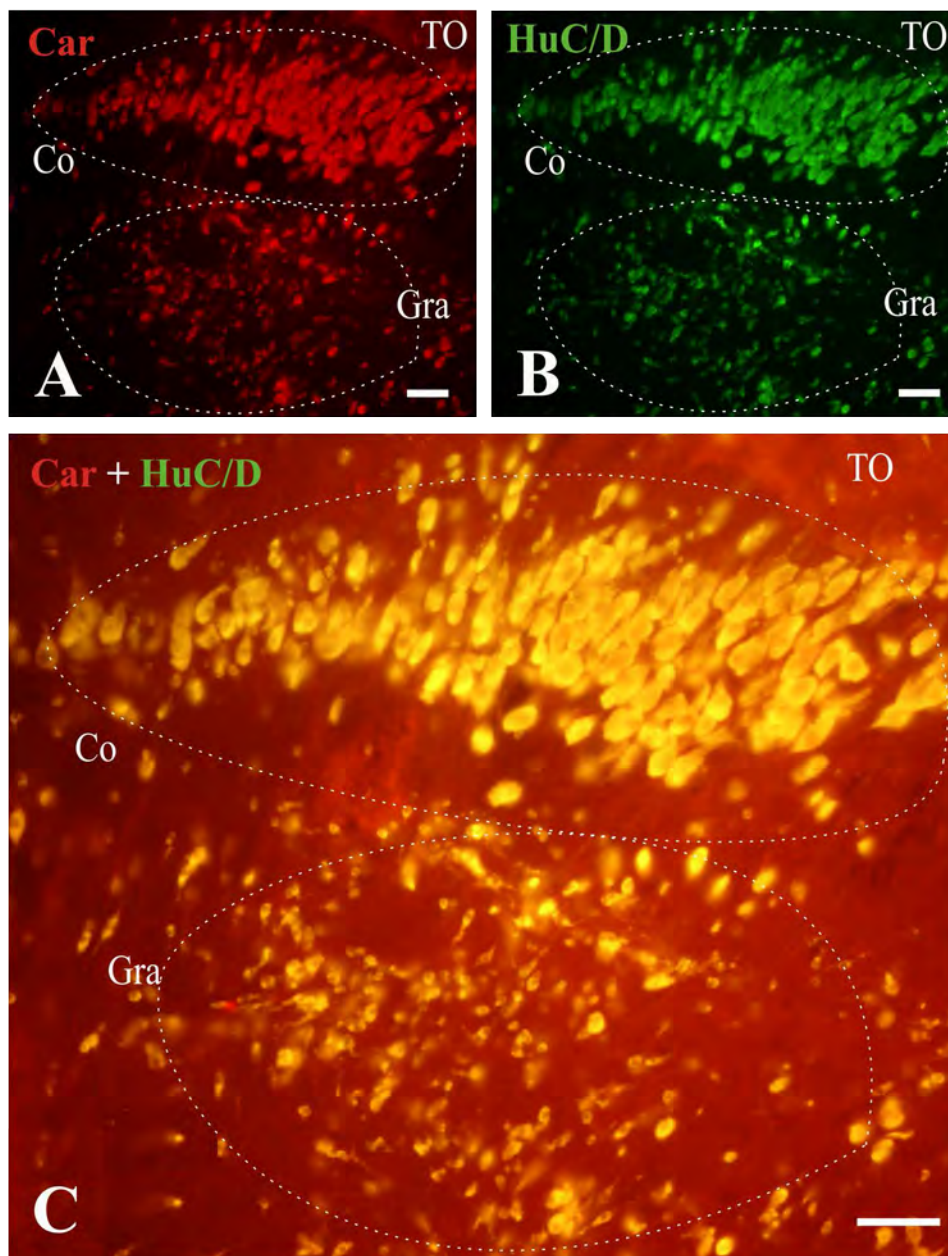


Fig. 17*: Microfotografías de confocal de secciones transversales del techo óptico del mágil en la región del núcleo cortical (Co) mostrando inmunofluorescencia a la carnosina (**A**), HuC/D (**B**) y colocalización de ambas sustancias (**C**). **A**, **B**, **C**, neuronas inmunorreactivas de gran tamaño en el núcleo cortical formando una lámina en el límite entre el techo óptico (dorsal, TO) y el pretecho, así como en el núcleo glomerular anterior (Gra), situado ventrolateralmente con respecto al núcleo cortical. Barras de escala = 50 μm .

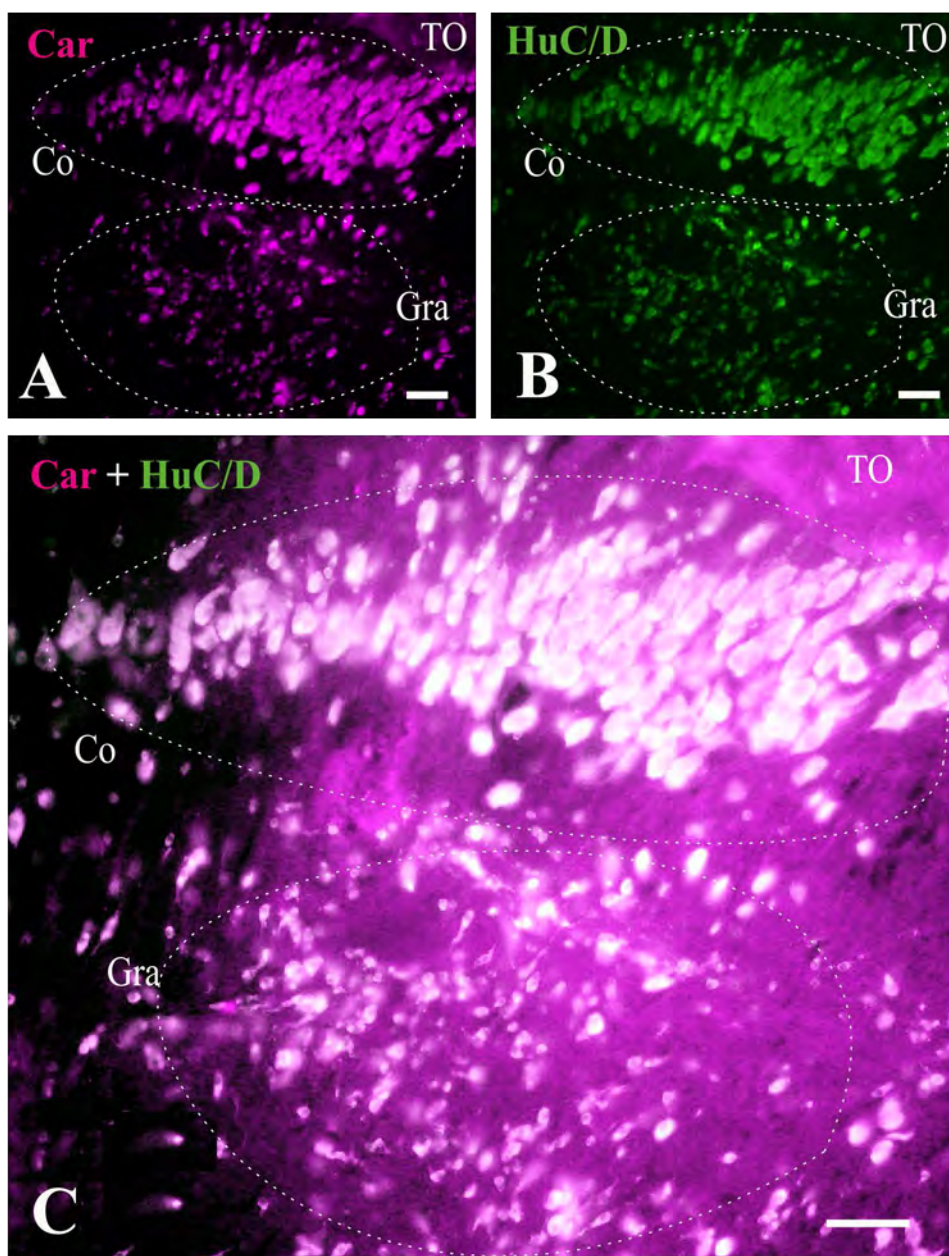


Fig. 18: Microfotografías de confocal de secciones transversales del techo óptico del mágil en la región del núcleo cortical (detalle) mostrando inmunofluorescencia a la carnosina (**A**), HuC/D (**B**), colocalización de ambas sustancias (**C**) y convertida a escala de grises e invertida como positiva (**D**). **A, B, C**, muestran neuronas Car-ir (**A**, **D**), neuronas HuC/D-ir (**B**) y colocalización de ambas sustancias (**C**) en el núcleo cortical mostrando grandes neuronas formando una lámina multiestratificada en el límite entre el techo óptico y el pretecho. Obsérvese que la inmunorreactividad para la carnosina se localiza principalmente en el citoplasma celular neuronal (**D**). Barra de escala = 20 μm .

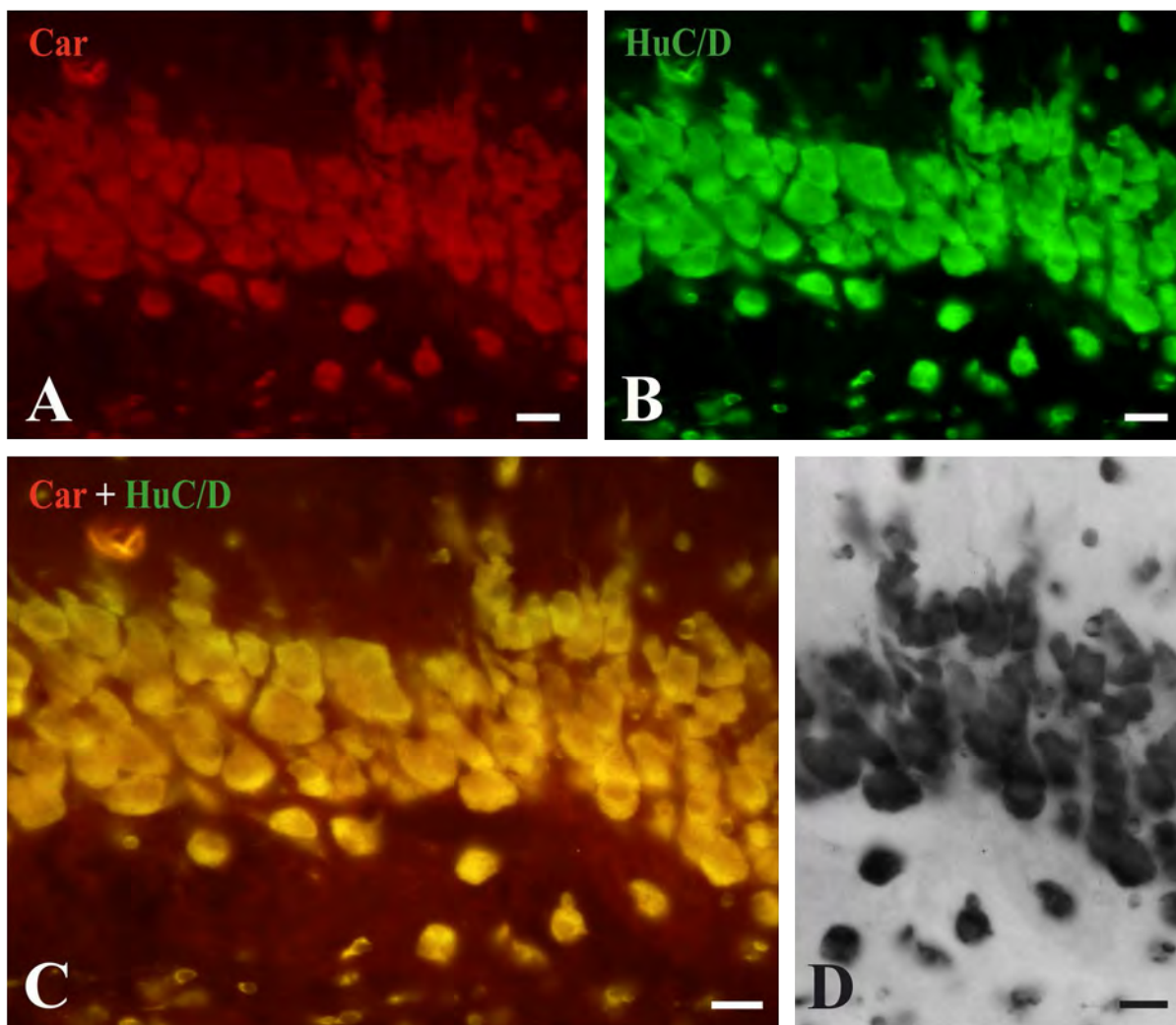


Fig. 18*: Microfotografías de confocal de secciones transversales del techo óptico del mágil en la región del núcleo cortical (detalle) mostrando inmunofluorescencia a la carnosina (**A**), HuC/D (**B**), colocalización de ambas sustancias (**C**) y convertida a escala de grises e invertida como positiva (**D**). **A, B, C**, muestran neuronas Car-ir (**A, D**), neuronas HuC/D-ir (**B**) y colocalización de ambas sustancias (**C**) en el núcleo cortical mostrando grandes neuronas formando una lámina multiestratificada en el límite entre el techo óptico y el pretecho. Obsérvese que la inmunorreactividad para la carnosina se localiza principalmente en el citoplasma celular neuronal (**D**). Barra de escala = 20 μm .

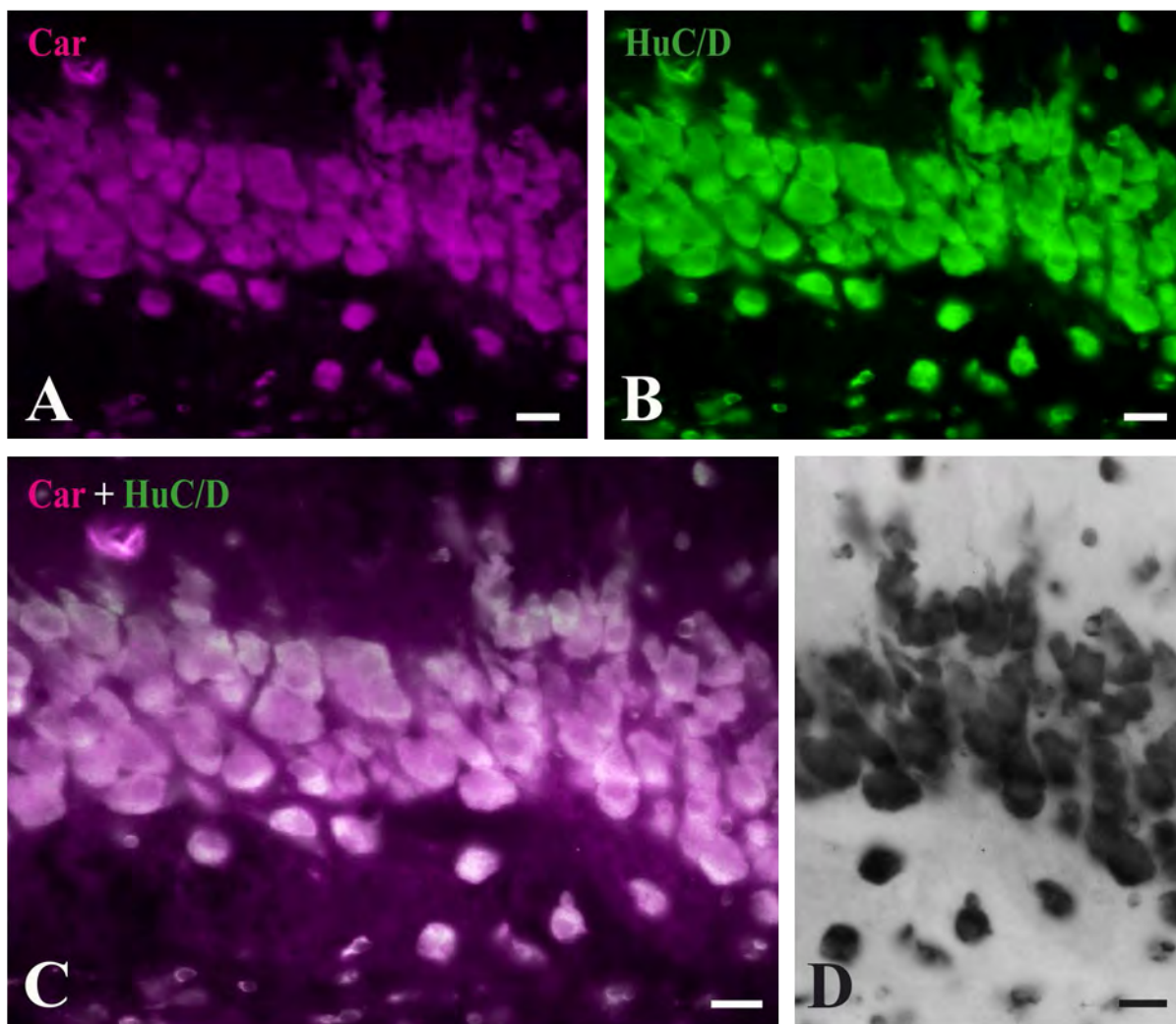


Fig. 19: Microfotografías de confocal (**A**, **B**, **C**) y de campo claro (**D**, **E**) de secciones transversales del toro longitudinal del múgil. **A**, **B**, **C**, neuronas de la zona dorsomedial (flechas blancas), células tipo granular (flechas negras) Car-ir (**A**), HuC/D-ir (**B**) y colocación de ambas sustancias (**C**), así como células gliales (cabezas de flecha negras) sólo Car-ir en la región de la comisura posterior (**A**, **C**). **D**, **E**, neuronas Car-ir dorsomediales y tipo granular (flechas blancas y negras en **D**), y detalle de neuronas dorsomediales (flechas blancas) y fibras Car-ir (cabezas de flecha negras en **E**). Obsérvese la presencia de botones sinápticos sobre los somas celulares (cabezas de flecha blancas) situados en la zona dorsal del toro (**E**). Barras de escala = 30 μm (**E**), 50 μm (**A**, **B**, **C**), 75 μm (**D**).

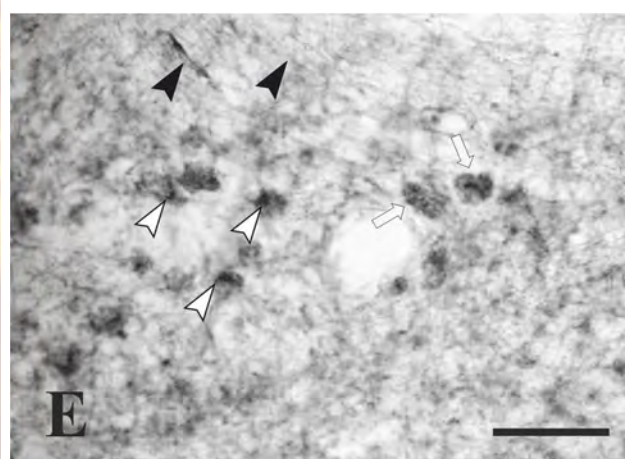
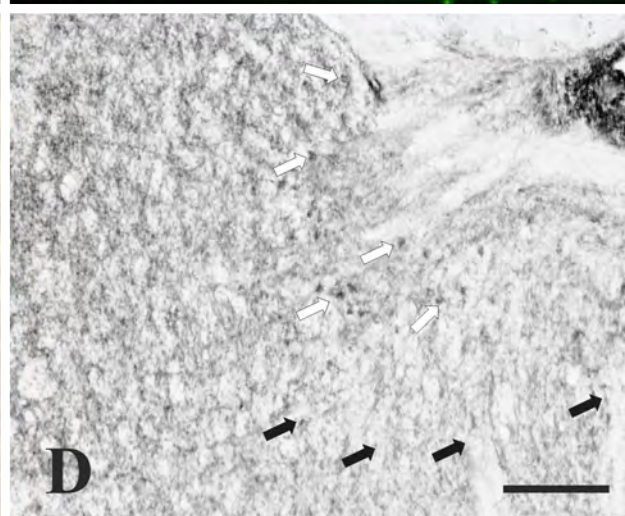
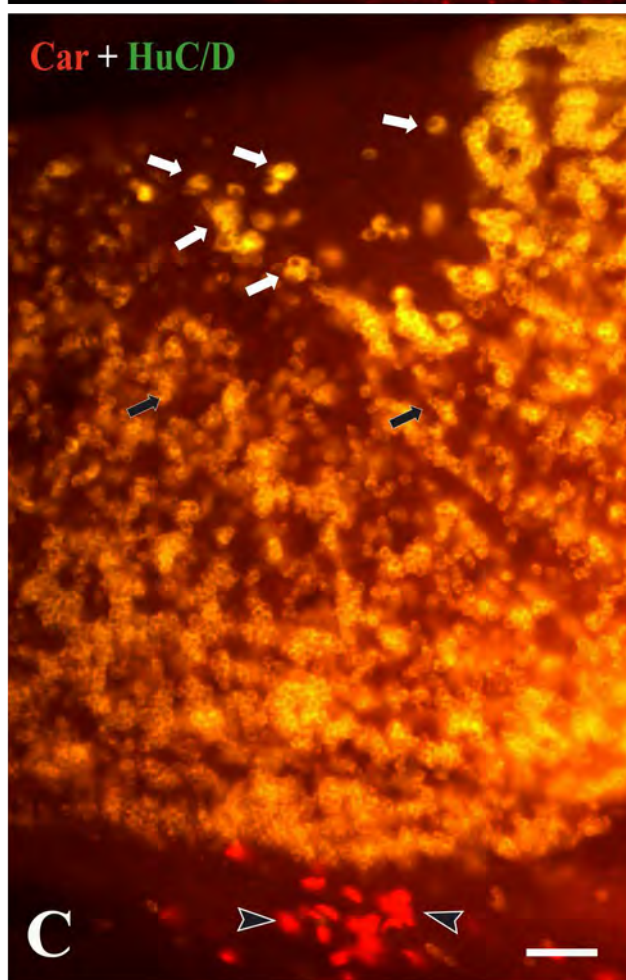
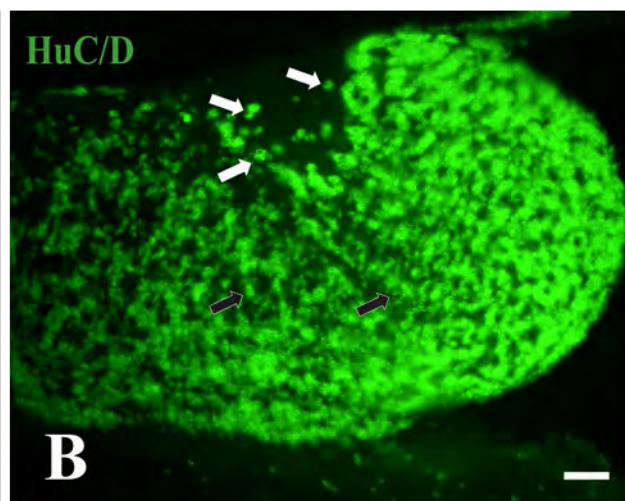
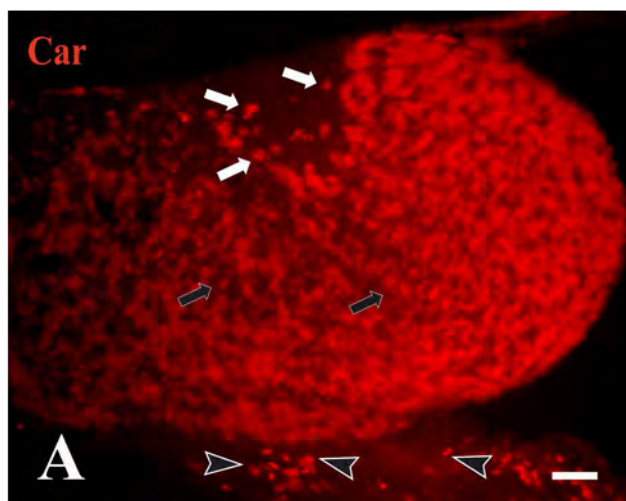


Fig. 19*: Microfotografías de confocal (**A**, **B**, **C**) y de campo claro (**D**, **E**) de secciones transversales del toro longitudinal del múgil. **A**, **B**, **C**, neuronas de la zona dorsomedial (flechas blancas), células tipo granular (flechas negras) Car-ir (**A**), HuC/D-ir (**B**) y colocación de ambas sustancias (**C**), así como células gliales (cabezas de flecha negras) sólo Car-ir en la región de la comisura posterior (**A**, **C**). **D**, **E**, neuronas Car-ir dorsomediales y tipo granular (flechas blancas y negras en **D**), y detalle de neuronas dorsomediales (flechas blancas) y fibras Car-ir (cabezas de flecha negras en **E**). Obsérvese la presencia de botones sinápticos sobre los somas celulares (cabezas de flecha blancas) situados en la zona dorsal del toro (**E**). Barras de escala = 30 μm (**E**), 50 μm (**A**, **B**, **C**), 75 μm (**D**).

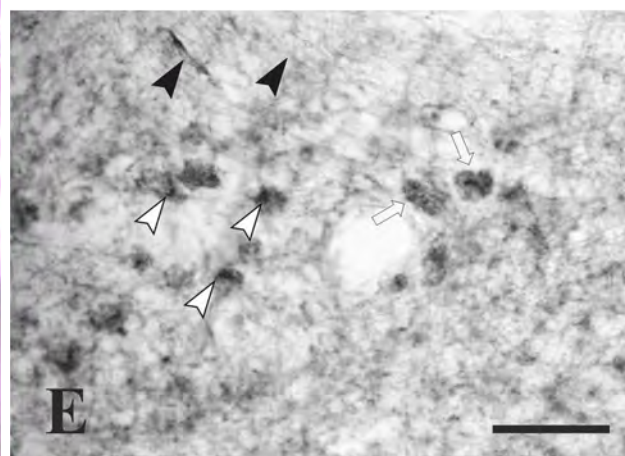
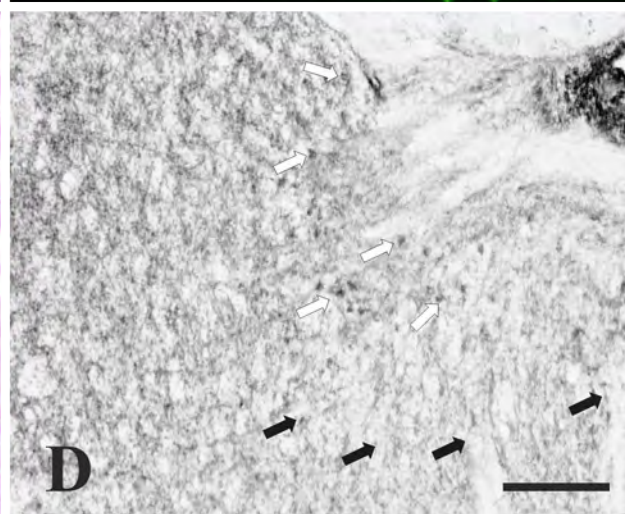
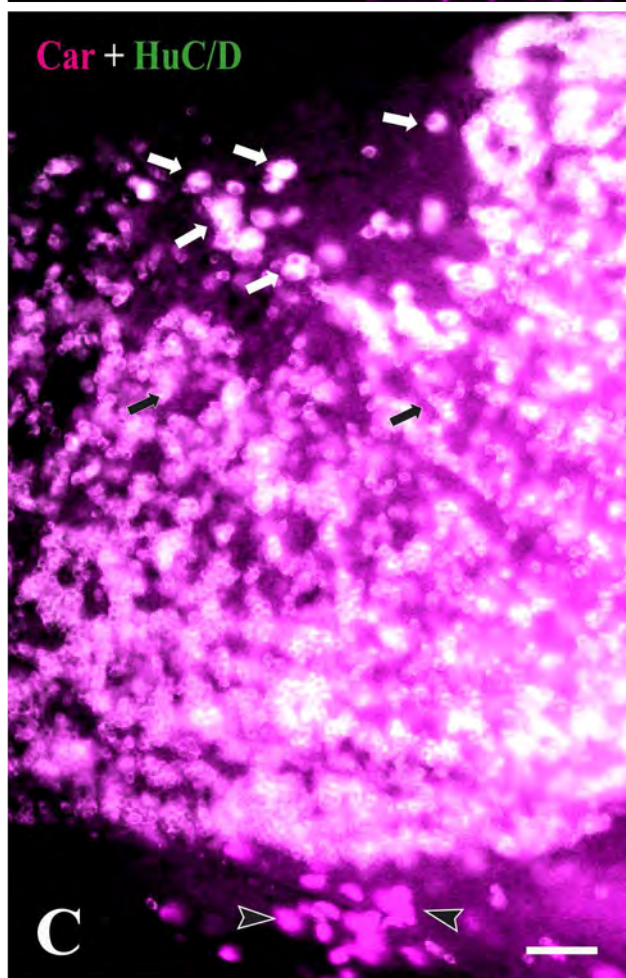
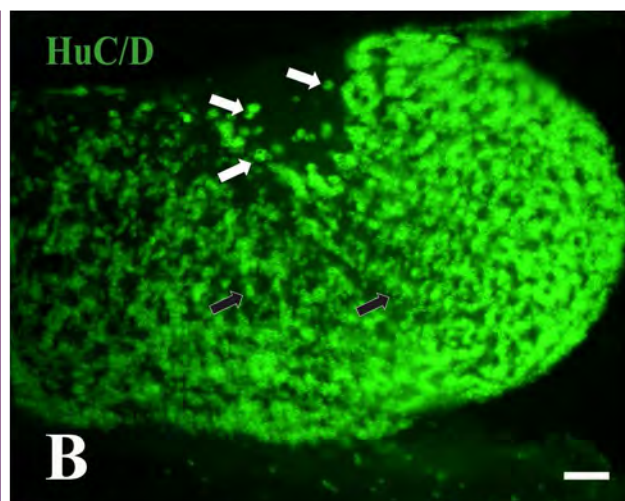
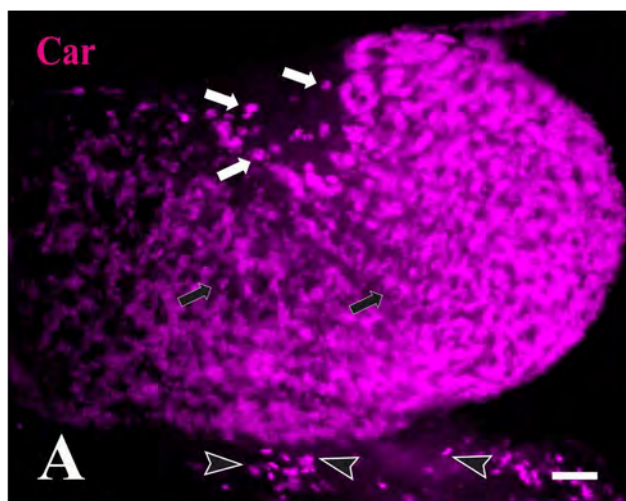


Fig. 20: Microfotografías de secciones transversales a nivel de la región del tegmento mesencefálico (**A, B, C, D**) y región del istmo (**E, F**) del múgil realizadas con microscopio confocal convertidas a escala de grises e invertidas como positivas (**A, C, D**) y campo claro (**B, E, F**). **A**, neuronas (flechas) Car-ir en posiciones centrales del toro semicircular. **B**, neuronas (flechas) de gran tamaño Car-ir del núcleo del fascículo longitudinal medial localizadas laterodorsalmente a dicho fascículo (flm). **C**, neuronas Car-ir del núcleo del nervio oculomotor (flechas). **D**, neuronas (flechas) Car-ir en el núcleo lateral de la válvula densamente agrupadas en posiciones dorsales. **E**, neuronas inmunorreactivas a la carnosina (flechas) del núcleo del istmo. **F**, neuronas Car-ir (flechas) del núcleo del nervio troclear, así como procesos neuronales (cabezas de flecha negras). Obsérvese la presencia de células endimocíticas Car-ir (cabezas de flecha blancas) a este nivel. Asterisco: tercer ventrículo (**B**), cuarto ventrículo (**F**). Barras de escala = 50 μm .

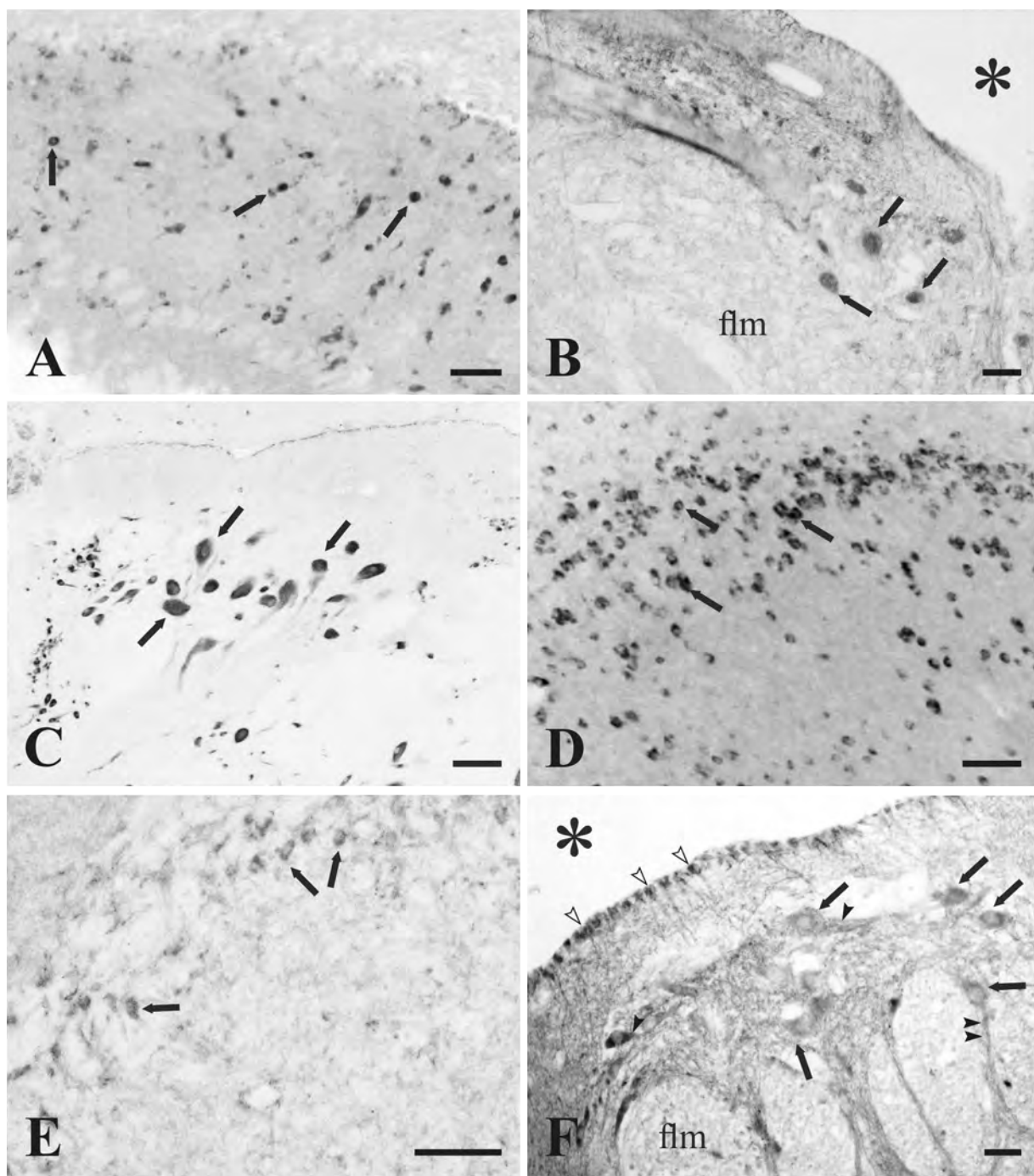


Fig. 21: Microfotografías de confocal de secciones transversales de la región del istmo del múgil convertidas a escala de grises e invertidas como positivas (**B, C, D**) y de campo claro (**A, E**). Asterisco: cuarto ventrículo. **A**, neuronas (flechas) Car-ir del *locus coeruleus* con numerosos botones sinápticos sobre sus somas (cabezas de flecha blancas). **B, C**, neuronas del núcleo gustatorio secundario Car-ir (flechas) en regiones rostral (**B**) y caudal (**C**). **D**, neuronas Car-ir de la gris central localizadas lateroventralmente al ventrículo. **E**, somas neuronales del núcleo interpeduncular (flechas), así como botones sinápticos Car-ir (cabezas de flecha blancas). Barras de escala = 20 μm (**E**), 25 μm (**A**), 50 μm (**C, D**), 100 μm (**B**).

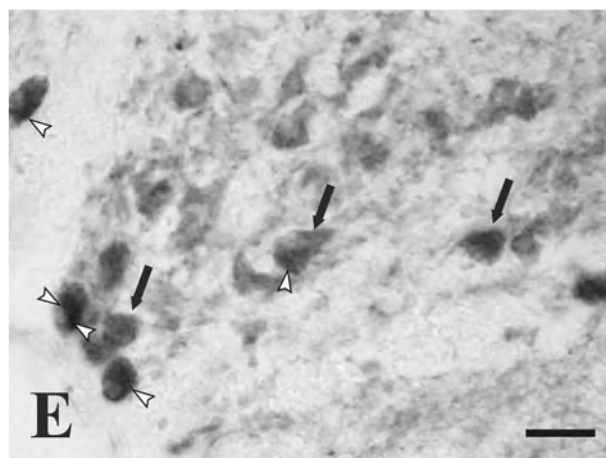
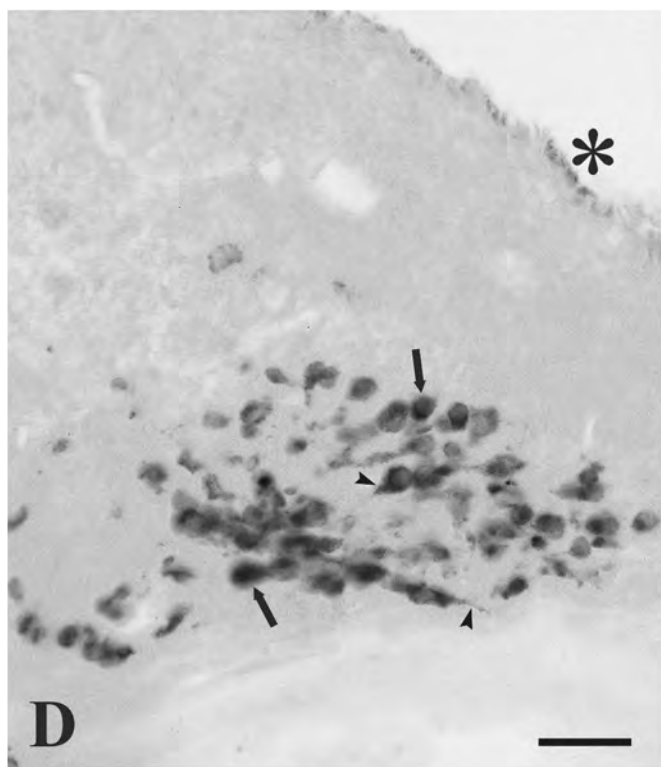
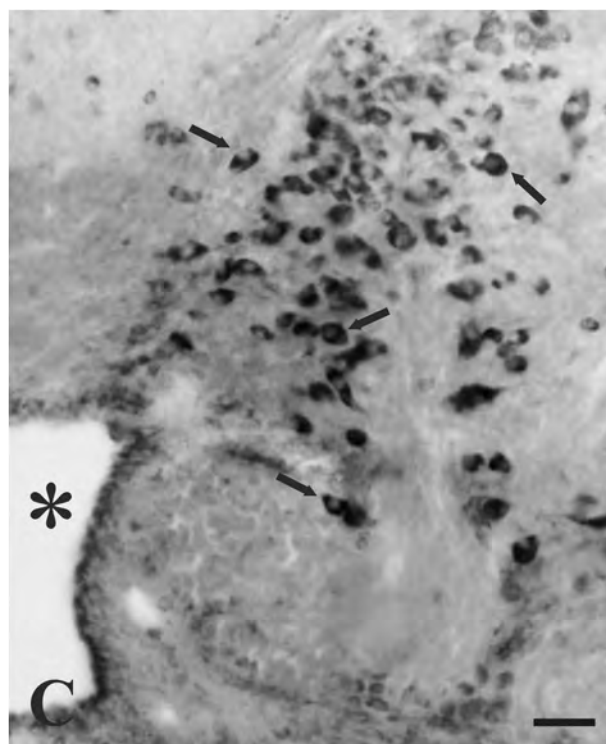
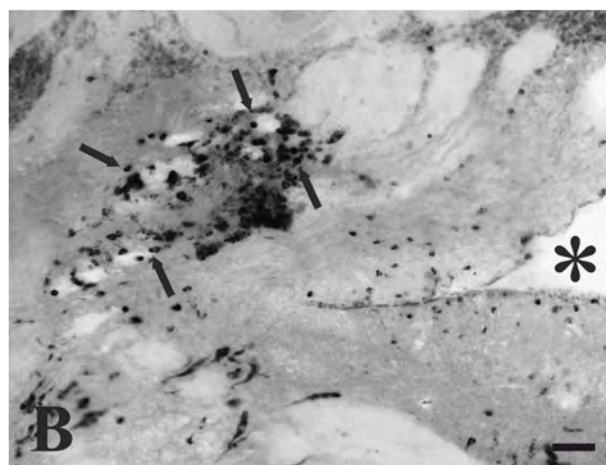
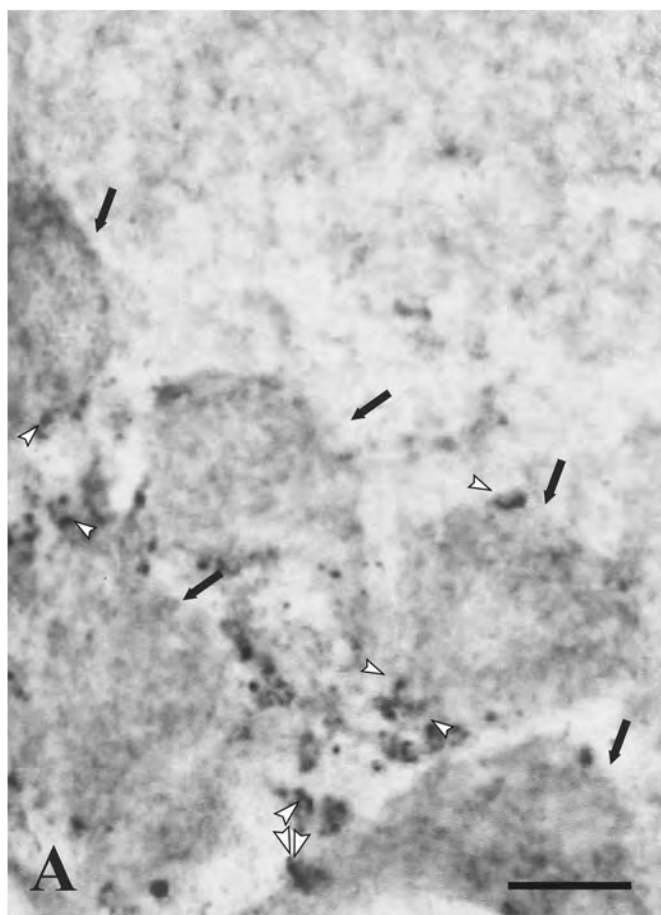


Fig. 22: Microfotografías de confocal (**A**, **B**, **C**) y de campo claro (**D**, **E**) de secciones transversales de la válvula cerebelosa del múgil, mostrando inmunofluorescencia a la carnosina (**A**), HuC/D (**B**) y colocación de ambas sustancias (**C**) e inmunorreactividad a la carnosina (**D**, **E**) en la capa granular (Cgr) del cuerpo cerebeloso. **A**, **B**, **C**, células de Golgi (flechas) inmunofluorescentes a la carnosina (**A**), HuC/D (**B**) y ambas sustancias (**C**). Obsérvese que las células granulares (cabezas de flecha) HuC/D-ir (**B**, **C**) no lo son a la carnosina. **D**, células de Golgi (flechas) inmunorreactivas a la carnosina en microfotografía de campo claro. **E**, detalle de células de Golgi (flechas), obsérvese asimismo la presencia de botones sinápticos sobre los somas (cabezas de flecha negras) y fibras nerviosas (cabezas de flecha blancas) Car-ir que pueden corresponder con fibras musgosas de los glomérulos cerebelosos. Barras de escala = 10 μm (**D**, **E**), 50 μm (**A**, **B**, **C**).

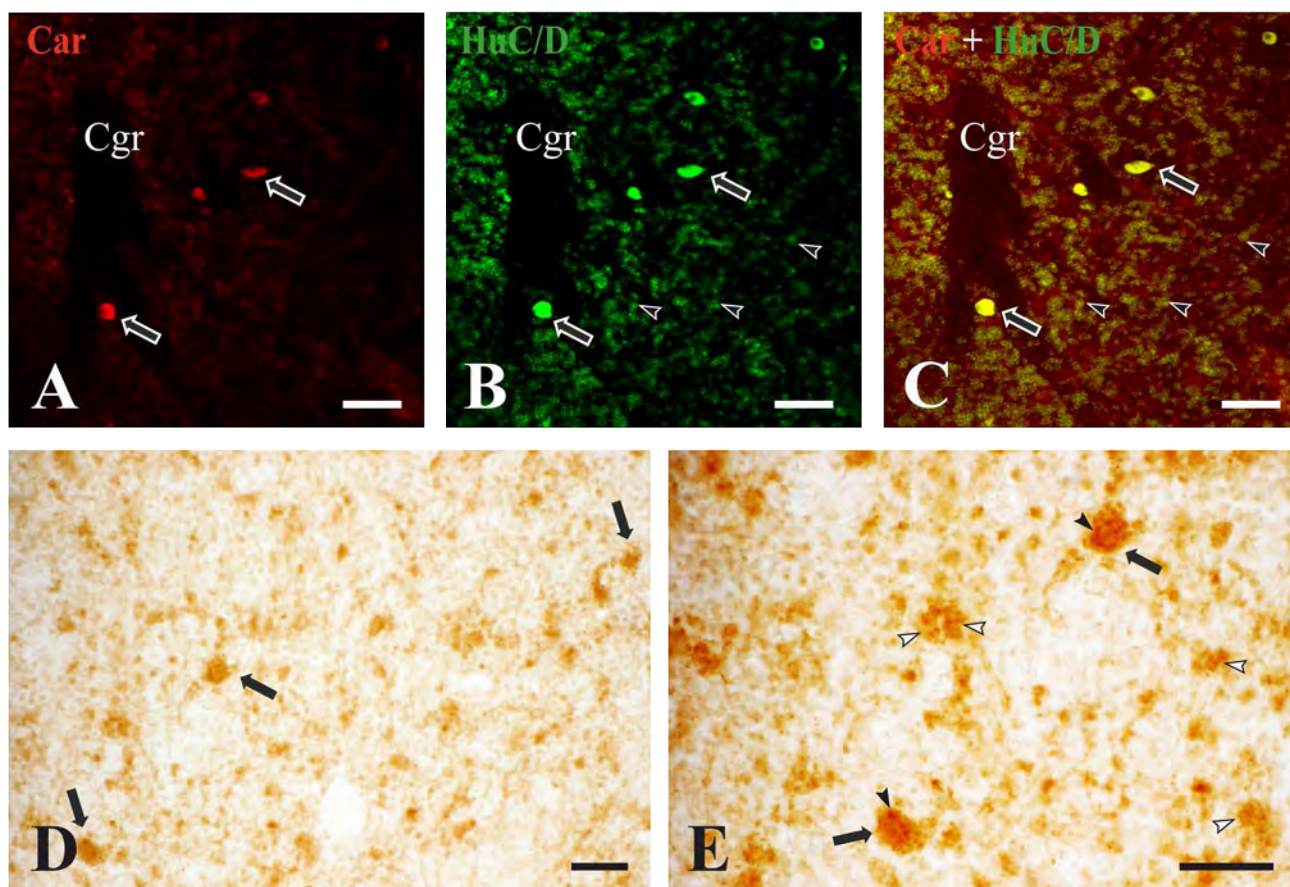


Fig. 22*: Microfotografías de confocal (**A**, **B**, **C**) y de campo claro (**D**, **E**) de secciones transversales de la válvula cerebelosa del múgil, mostrando inmunofluorescencia a la carnosina (**A**), HuC/D (**B**) y colocación de ambas sustancias (**C**) e inmunorreactividad a la carnosina (**D**, **E**) en la capa granular (Cgr) del cuerpo cerebeloso. **A**, **B**, **C**, células de Golgi (flechas) inmunofluorescentes a la carnosina (**A**), HuC/D (**B**) y ambas sustancias (**C**). Obsérvese que las células granulares (cabezas de flecha) HuC/D-ir (**B**, **C**) no lo son a la carnosina. **D**, células de Golgi (flechas) inmunorreactivas a la carnosina en microfotografía de campo claro. **E**, detalle de células de Golgi (flechas), obsérvese asimismo la presencia de botones sinápticos sobre los somas (cabezas de flecha negras) y fibras nerviosas (cabezas de flecha blancas) Car-ir que pueden corresponder con fibras musgosas de los glomérulos cerebelosos. Barras de escala = 10 μm (**D**, **E**), 50 μm (**A**, **B**, **C**).

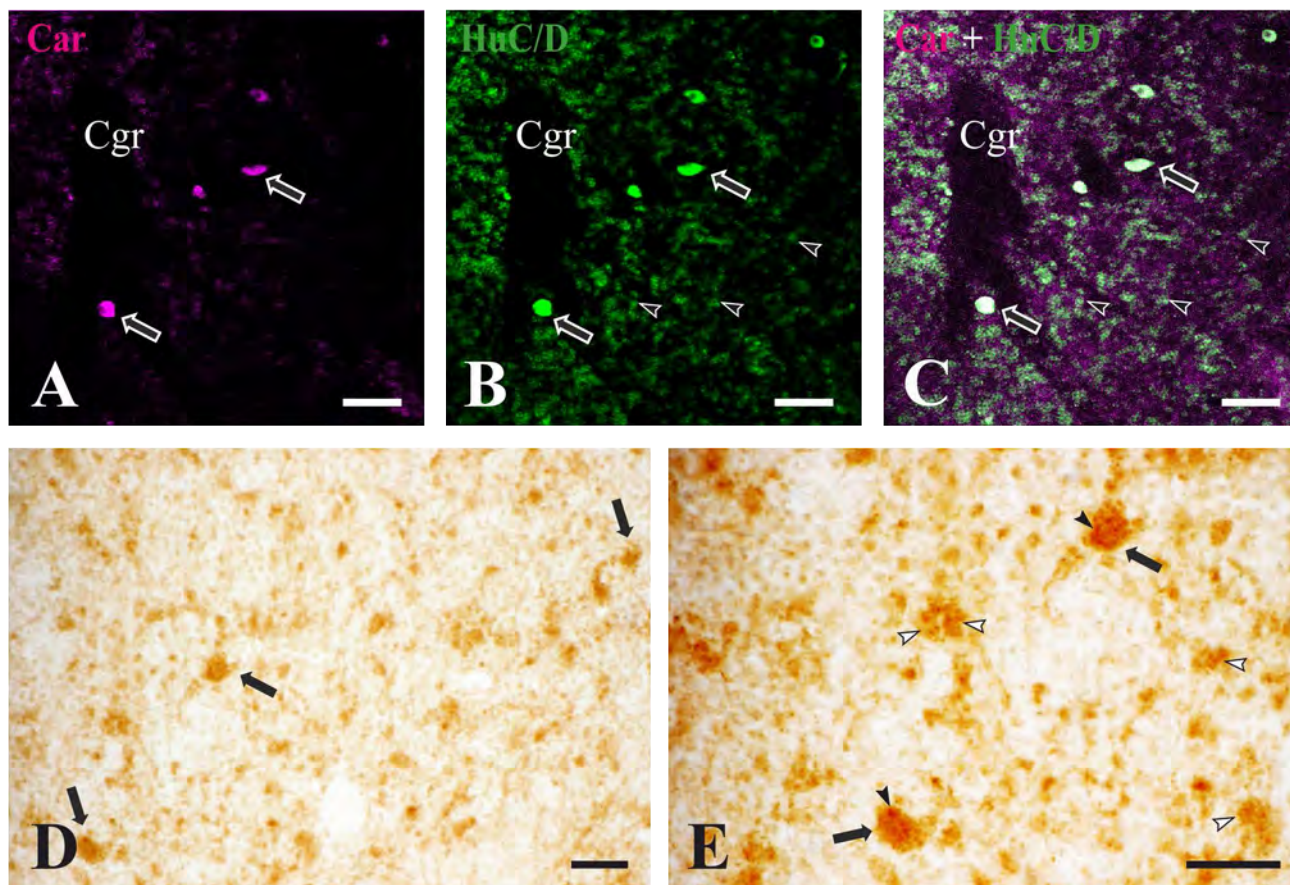


Fig. 23: Microfotografías de confocal de secciones transversales del cuerpo cerebeloso del mágil, mostrando inmunofluorescencia a la carnosina (**A**), HuC/D (**B**) y colocación de ambas sustancias (**C**, **D**) en las capas granular (Cgr), capa ganglionar (CGL) y molecular (CM) cerebelosas. **A**, **B**, **C**, células de Purkinje Car-ir (flechas blancas) de la capa ganglionar cerebelosa. Las cabezas de flecha indican las neuronas Car-ir presentes en la capa molecular que podrían corresponder con células estrelladas y las flechas negras señalan las células de Golgi. **D**, células de Purkinje Car-ir (flechas blancas) en la capa ganglionar, células estrelladas Car-ir (cabezas de flecha) en la capa molecular y células de Golgi Car-ir (flechas negras) en la capa granular del cuerpo cerebeloso. Barras de escala = 50 μm (**A**, **B**, **C**), 150 μm (**D**).

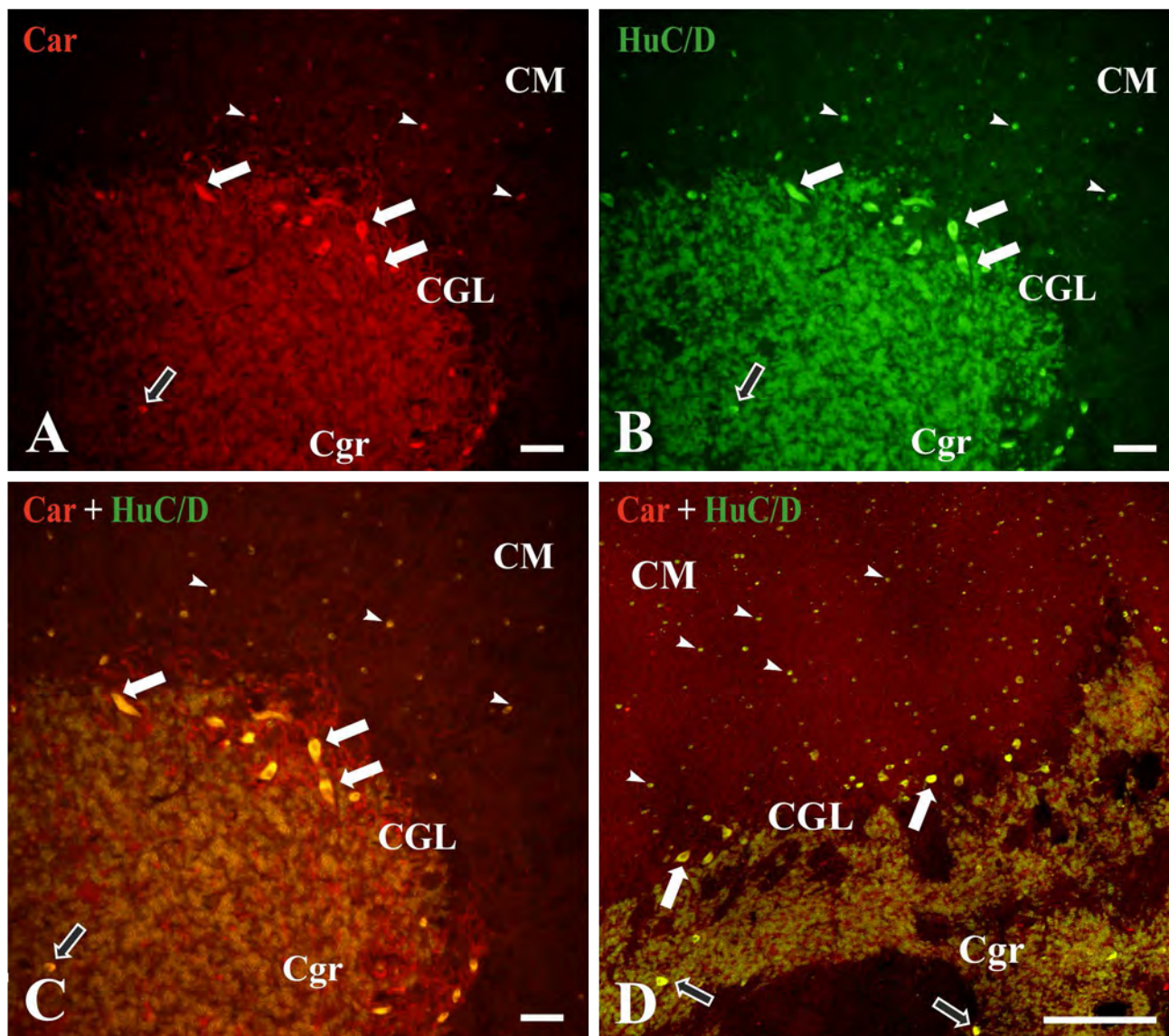


Fig. 23*: Microfotografías de confocal de secciones transversales del cuerpo cerebeloso del mágil, mostrando inmunofluorescencia a la carnosina (**A**), HuC/D (**B**) y colocación de ambas sustancias (**C**, **D**) en las capas granular (Cgr), capa ganglionar (CGL) y molecular (CM) cerebelosas. **A**, **B**, **C**, células de Purkinje Car-ir (flechas blancas) de la capa ganglionar cerebelosa. Las cabezas de flecha indican las neuronas Car-ir presentes en la capa molecular que podrían corresponder con células estrelladas y las flechas negras señalan las células de Golgi. **D**, células de Purkinje Car-ir (flechas blancas) en la capa ganglionar, células estrelladas Car-ir (cabezas de flecha) en la capa molecular y células de Golgi Car-ir (flechas negras) en la capa granular del cuerpo cerebeloso. Barras de escala = 50 μm (**A**, **B**, **C**), 150 μm (**D**).

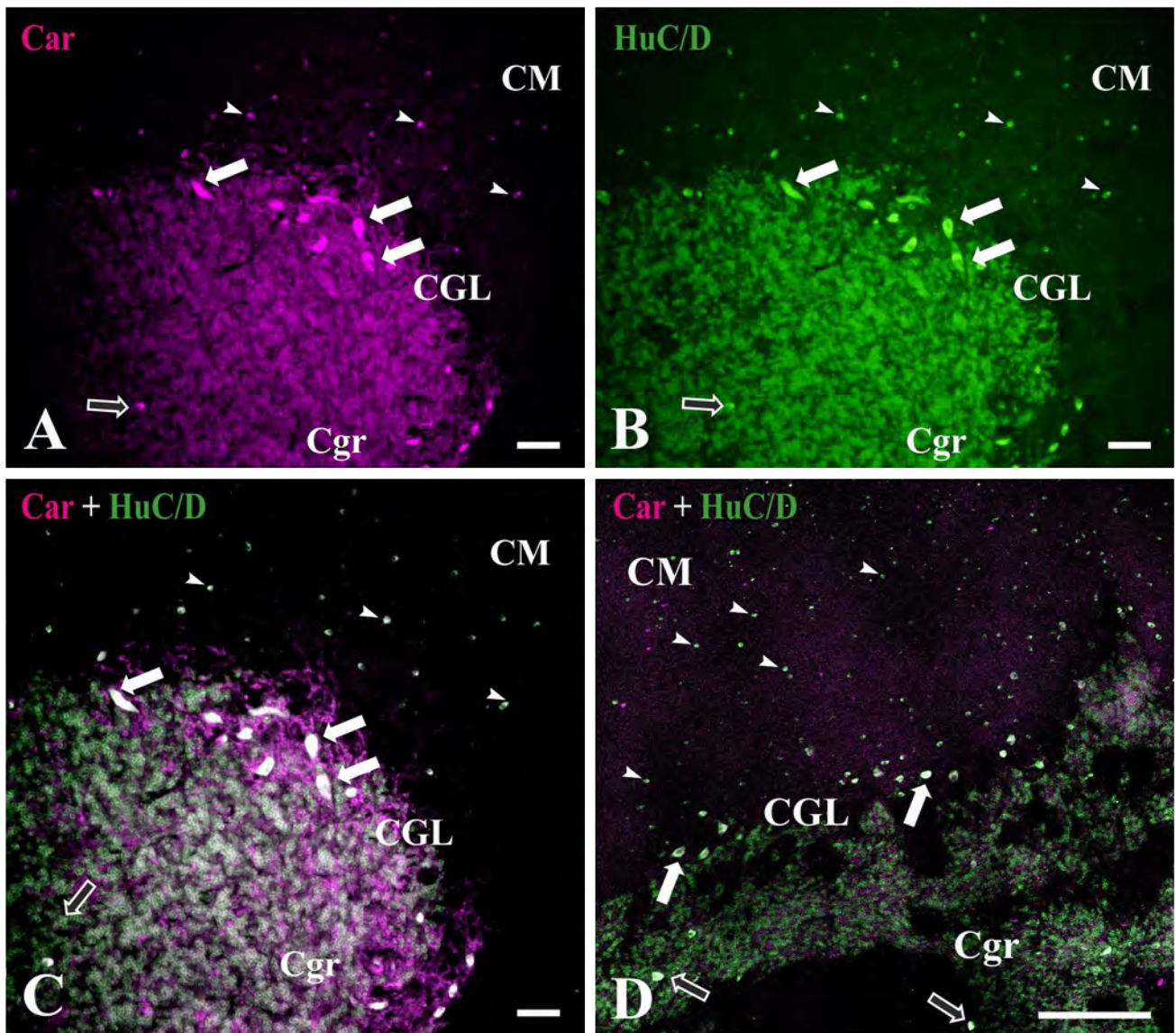


Fig. 24: Microfotografías de confocal (**A, B, C, E**), convertida a escala de grises e invertida como positiva (**E**), y de campo claro (**D, F, G, H**) de secciones transversales del cuerpo cerebeloso del mágil, mostrando inmunofluorescencia a la carnosina (**A, E**), HuC/D (**B**), ambas sustancias (**C**) e inmunorreactividad a la carnosina (**D, F, G, H**). **A, B, C**, células de Purkinje (flechas blancas) en la capa ganglionar cerebelosa (CGL). **D**, cuerpos neuronales de células de Purkinje a lo largo de toda la capa ganglionar. **E**, neuronas Car-ir (cabezas de flecha) de la capa molecular cerebelosa, posiblemente correspondientes a células estrelladas. **F, G, H**, detalle de células de Purkinje Car-ir (flechas negras) donde se pueden observar procesos celulares también Car-ir (flechas blancas), además de botones sinápticos sobre sus somas celulares (cabezas de flecha blancas). Barras de escala = 10 μm (**G, H**), 20 μm (**F**), 50 μm (**A, B, C, E**), 150 μm (**D**).

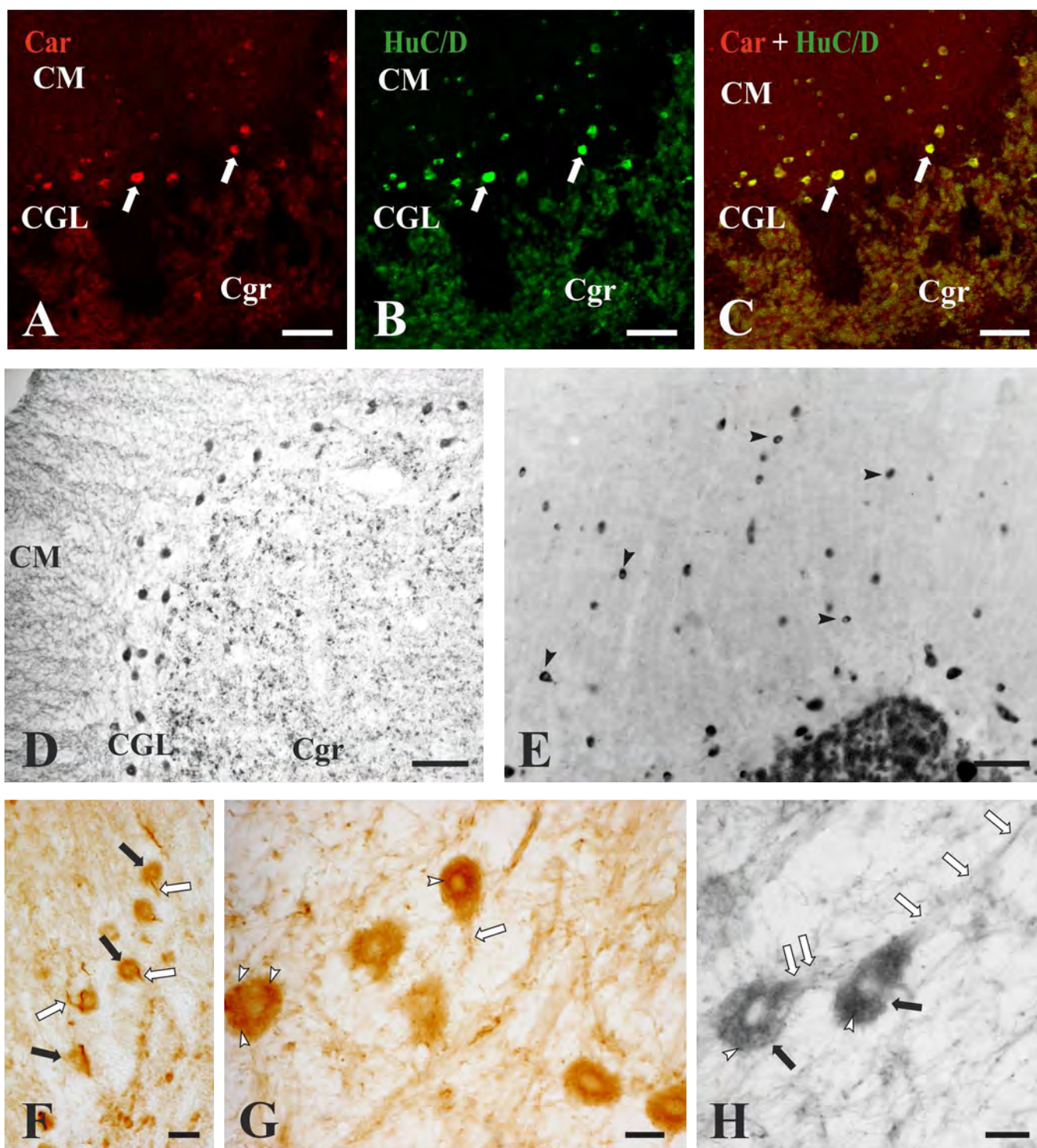


Fig. 24*: Microfotografías de confocal (**A, B, C, E**), convertida a escala de grises e invertida como positiva (**E**), y de campo claro (**D, F, G, H**) de secciones transversales del cuerpo cerebeloso del mágil, mostrando inmunofluorescencia a la carnosina (**A, E**), HuC/D (**B**), ambas sustancias (**C**) e inmunorreactividad a la carnosina (**D, F, G, H**). **A, B, C**, células de Purkinje (flechas blancas) en la capa ganglionar cerebelosa (CGL). **D**, cuerpos neuronales de células de Purkinje a lo largo de toda la capa ganglionar. **E**, neuronas Car-ir (cabezas de flecha) de la capa molecular cerebelosa, posiblemente correspondientes a células estrelladas. **F, G, H**, detalle de células de Purkinje Car-ir (flechas negras) donde se pueden observar procesos celulares también Car-ir (flechas blancas), además de botones sinápticos sobre sus somas celulares (cabezas de flecha blancas). Barras de escala = 10 μm (**G, H**), 20 μm (**F**), 50 μm (**A, B, C, E**), 150 μm (**D**).

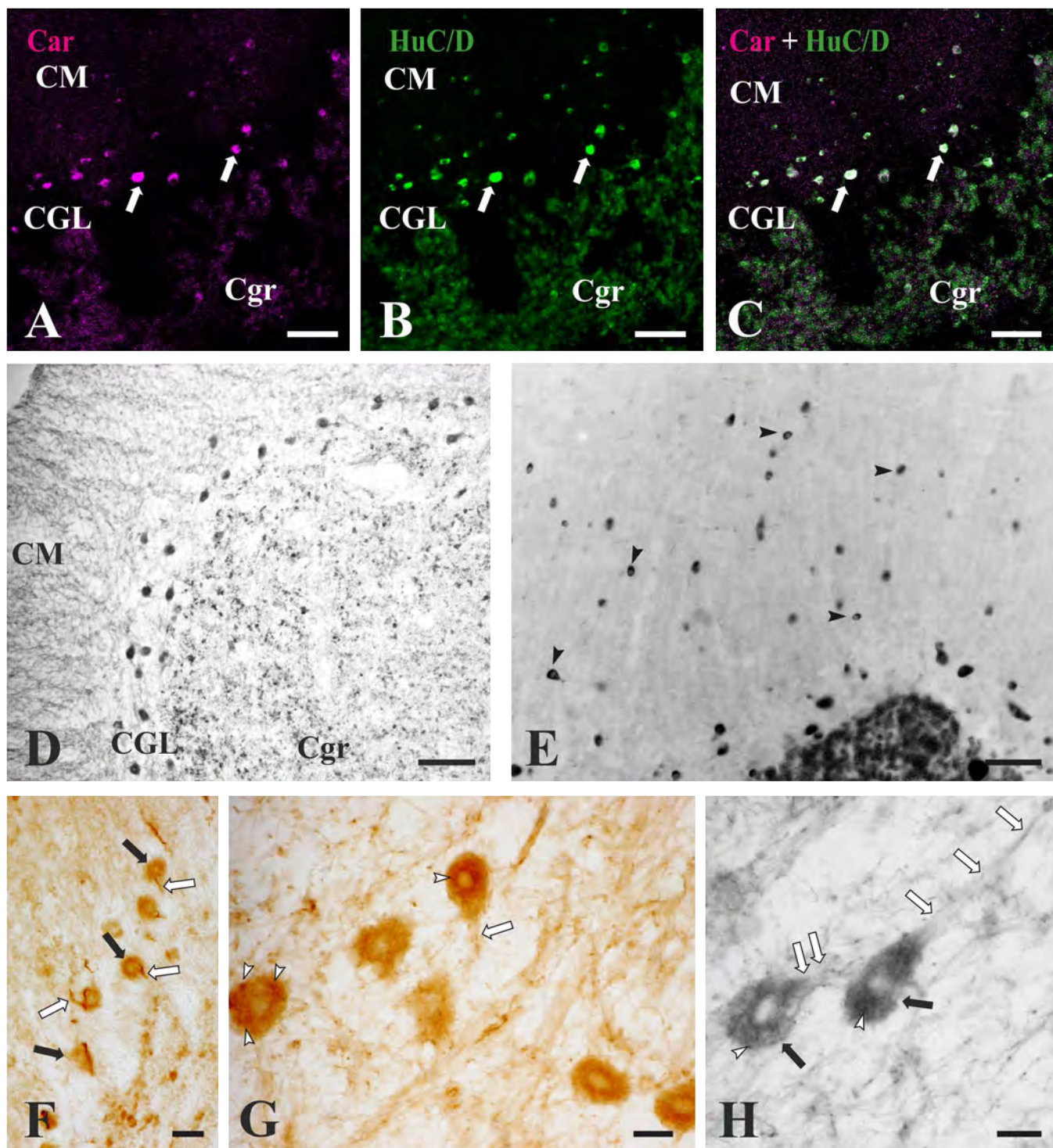


Fig. 25: Microfotografías de confocal (**B**, **E**), convertida a escala de grises e invertida como positiva (**E**), y de campo claro (**A**, **C**, **D**) de secciones transversales del bulbo raquídeo del mágil, mostrando neuronas Car-ir en núcleos de los nervios del V, VI, VII y IX par. **A**, **B**, neuronas (flechas) inmunorreactivas a la carnosina y HuC/D (**B**) en el núcleo del nervio trigémino; obsérvese asimismo procesos también inmunorreactivos a la carnosina (cabezas de flecha negras), así como botones sinápticos en la superficie de los somas neuronales (cabezas de flecha blancas). **C**, neuronas Car-ir (flechas) y fibras Car-ir (cabezas de flecha) del núcleo del nervio abducente. **D**, neuronas Car-ir (flechas) y fibras Car-ir (cabezas de flecha) del núcleo del nervio facial. Obsérvese la raíz motora del nervio con fibras Car-ir. **E**, neuronas Car-ir (flechas) y fibras Car-ir (cabezas de flecha) del núcleo del nervio glossofaríngeo. Barras de escala = 20 μm (**B**, **E**), 50 μm (**A**, **C**, **D**).

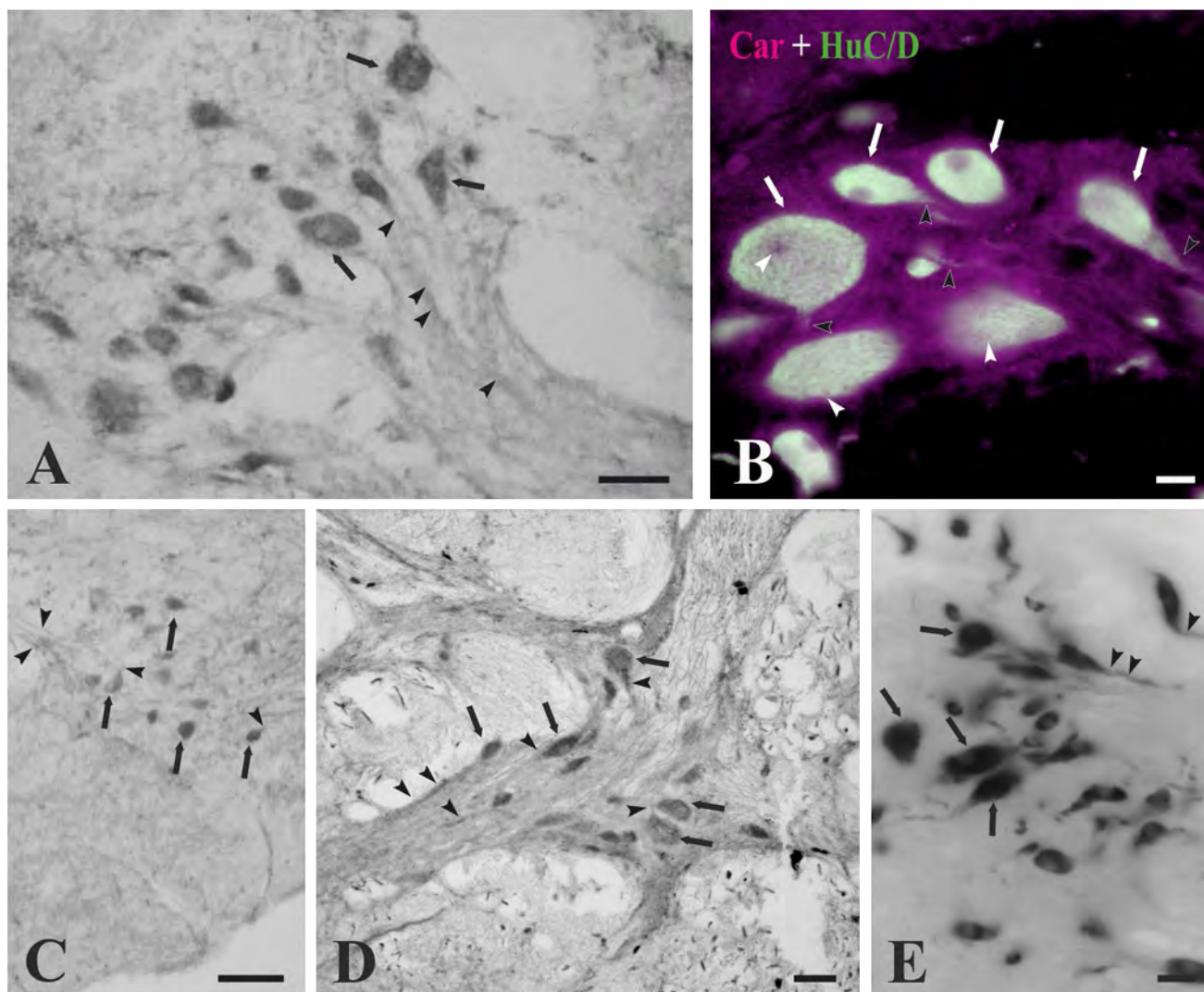


Fig. 26: Microfotografías de campo claro (**B**) y de confocal convertidas a escala de grises e invertidas como positivas (**A, C, D, E**) de secciones transversales del bulbo raquídeo (**A, B, C, D**) y del ganglio del vago (**E**) del múgil, mostrando neuronas (flechas) y fibras (cabezas de flecha) Car-ir. **A**, neuronas Car-ir (flechas) y procesos neuronales (cabezas de flecha) del núcleo motor del nervio vago (X par). **B**, neuronas Car-ir (flechas) y procesos neuronales (cabezas de flecha) del núcleo tangencial del nervio vestibular (VIII par). **C**, neuronas Car-ir (flechas) y procesos neuronales (cabezas de flecha) del núcleo vestibular magnocelular. **D**, neuronas Car-ir (flechas) y botones sinápticos sobre el soma neuronal (cabezas de flecha abiertas) de la porción bulbar del núcleo reticular superior. **E**, células ganglionares del ganglio del vago Car-ir (flechas). Barras de escala = 20 μm (**A, B, C**), 50 μm (**D**), 100 μm (**E**).

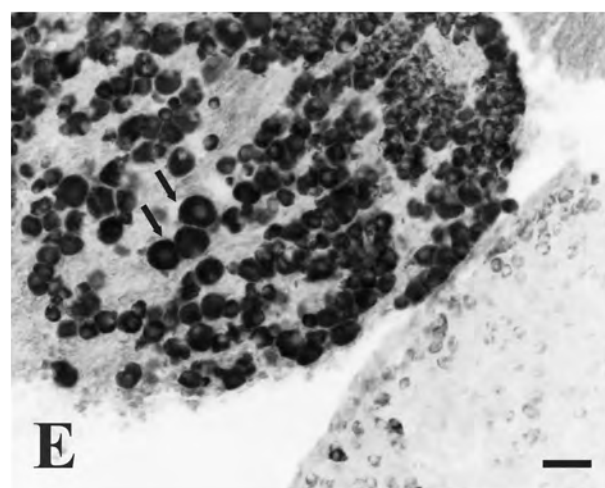
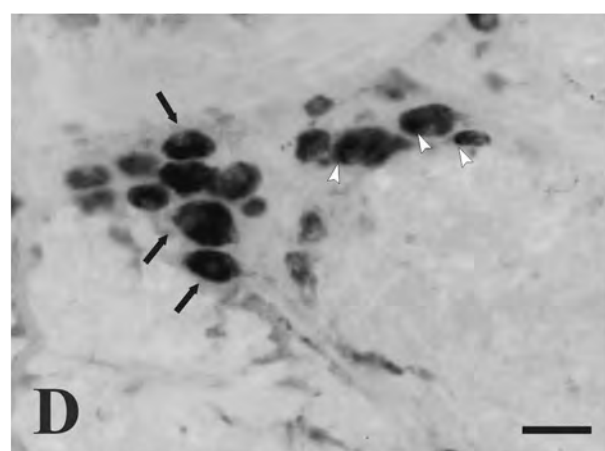
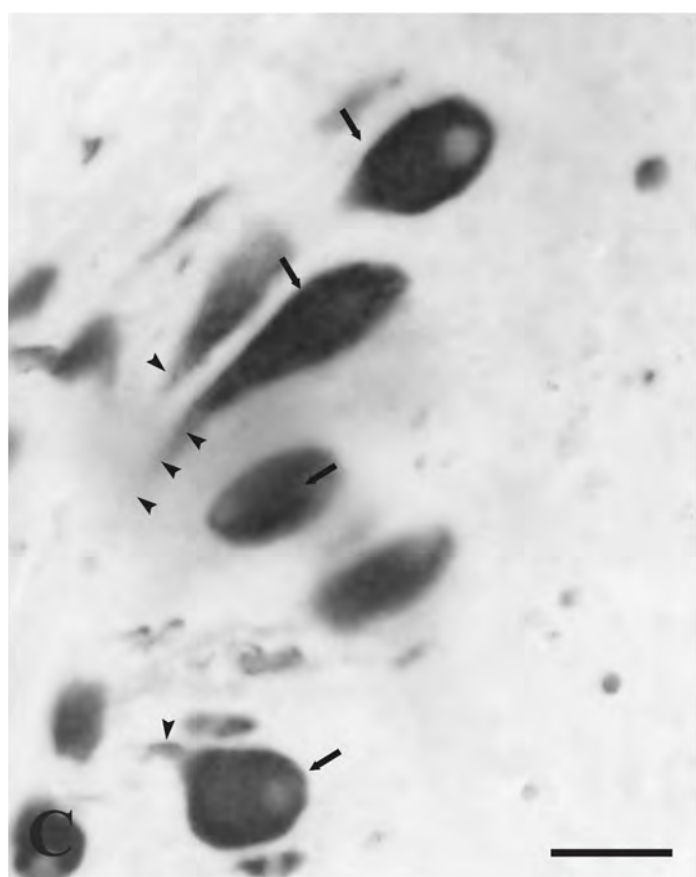
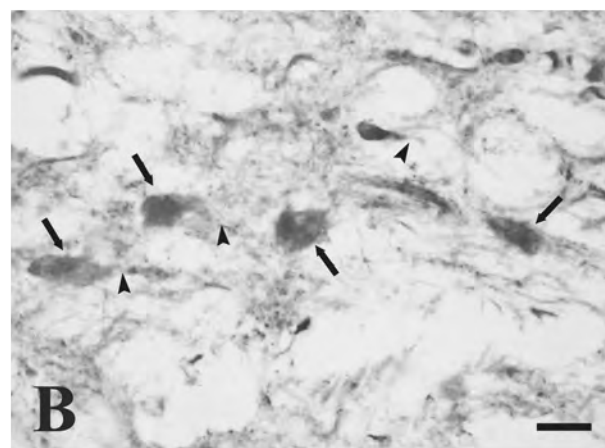
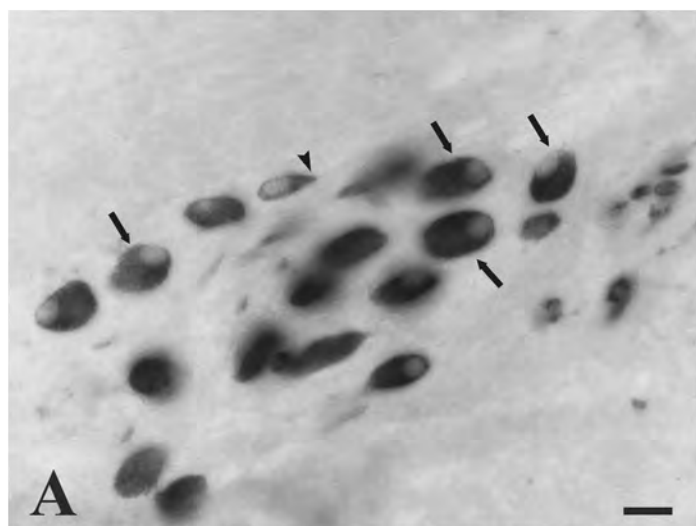


Fig. 27: Microfotografías de campo claro (**B**) y confocal convertidas a escala de grises e invertidas como positivas (**A, C, D, E**) de secciones transversales del ganglio del vago (**A**) y bulbo raquídeo (**B, C, D, E**) del mágil, mostrando neuronas Car-ir (flechas) y fibras Car-ir (cabezas de flecha). **A**, detalle de células ganglionares Car-ir (flechas) del ganglio del vago mostrando también fibras Car-ir (cabezas de flecha) de la raíz sensorial del vago. **B**, dendritas (cabezas de flecha negras) así como botones sinápticos (cabezas de flecha blancas) Car-ir presentes en las células de la cresta. **C, D**, neuronas Car-ir (flechas) y fibras (cabezas de flecha) del núcleo reticular medial, situado lateralmente al fascículo longitudinal medial (flm). **E**, neuronas Car-ir (flechas) presentes en la columna viscerosensorial. Barras de escala = 10 μm (**B**), 25 μm (**D**), 50 μm (**A, C, E**).

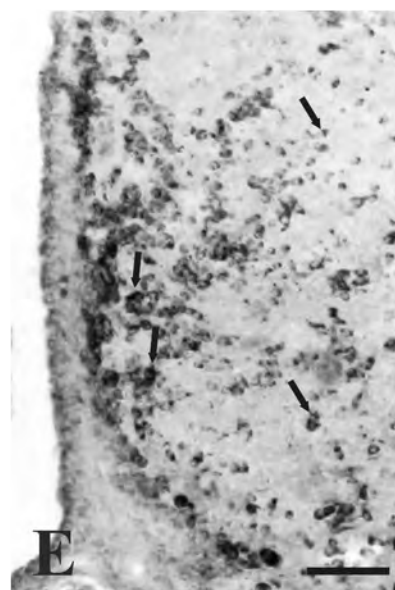
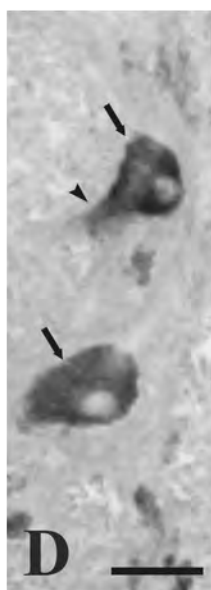
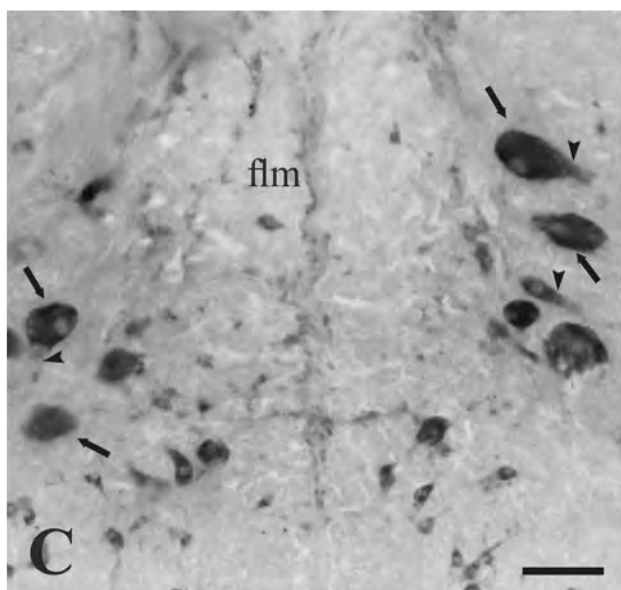
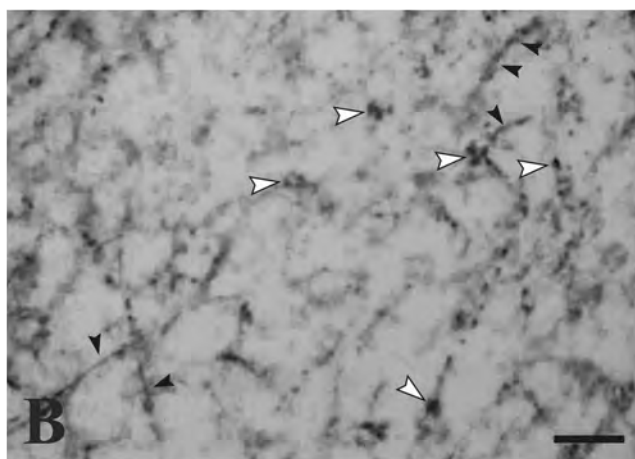
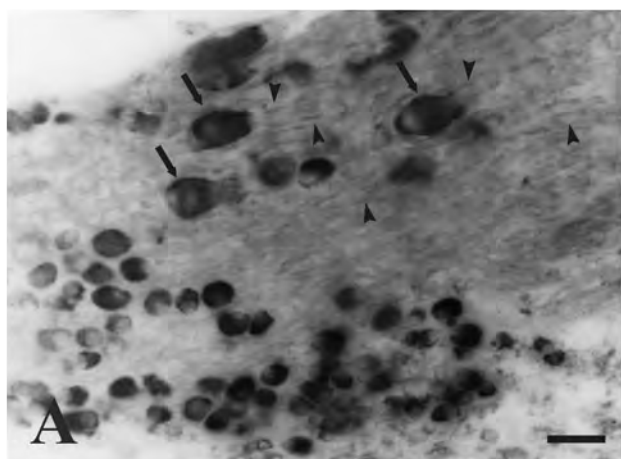
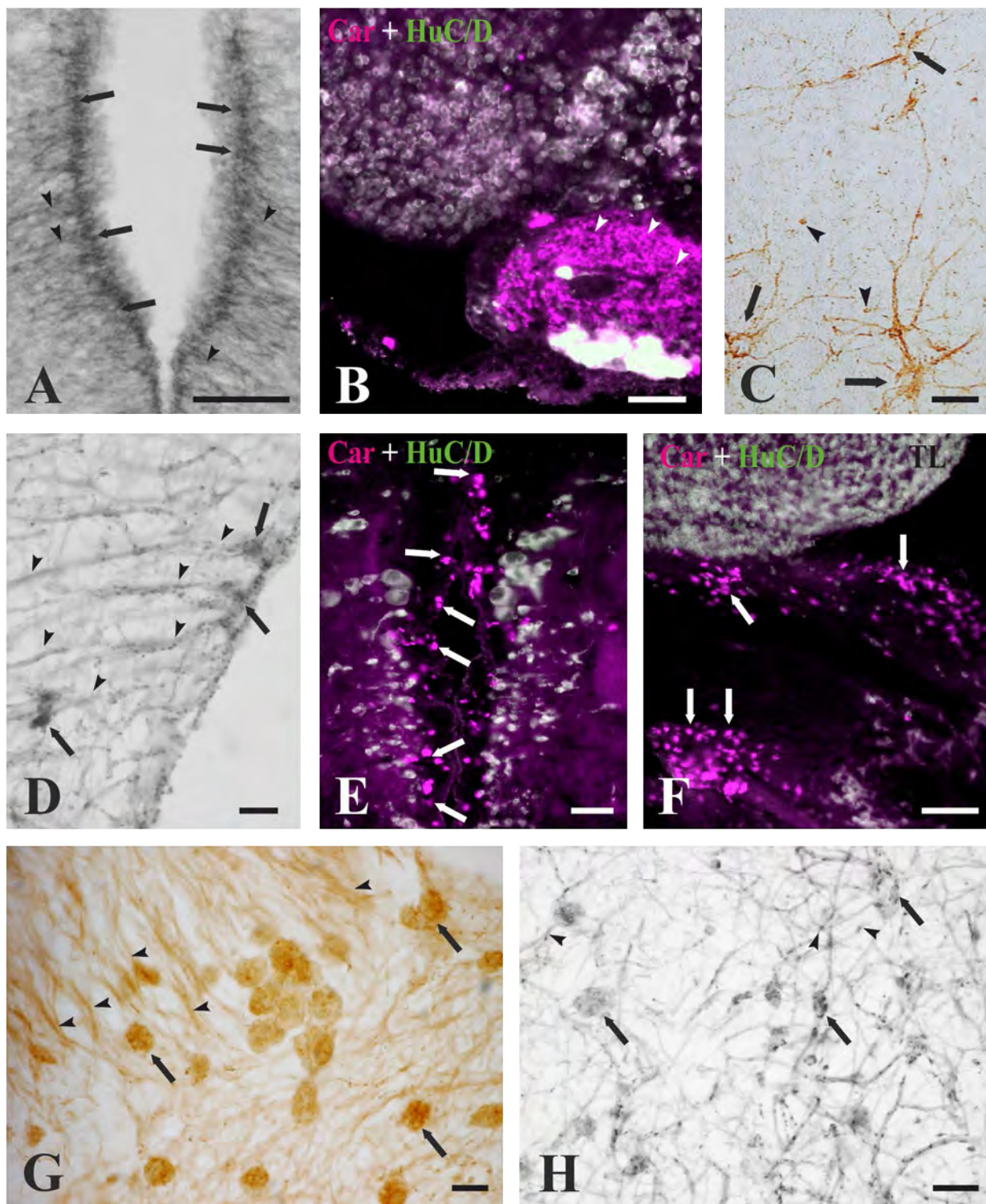


Fig. 28: Microfotografías de confocal (**B, E, F**) y de campo claro (**A, C, D, G, H**) de secciones transversales de diferentes regiones del encéfalo del mágil, mostrando células gliales Car-ir (flechas) y prolongaciones celulares Car-ir (cabezas de flecha). **A**, células gliales (flechas) y procesos (cabezas de flecha) Car-ir en el epéndimo del área dorsal telencefálica. **B**, tractos Car-ir (cabezas de flecha) localizados en el nervio óptico. **C**, astrocitos reticulares Car-ir (flechas) del nervio óptico, presentando una morfología estrellada con varios procesos celulares; las cabezas de flecha señalan supuestas células de la microglía de muy pequeño tamaño localizadas en el nervio óptico. **D, E**, células gliales Car-ir (flechas) localizadas en el epéndimo y zonas subependimarias de regiones próximas al núcleo talámico dorsomedial. Las cabezas de flecha indican prologaciones Car-ir de estas células. **F**, células gliales Car-ir (flechas) situadas bajo el toro longitudinal (TL) en porciones rostrales de la comisura posterior. **G, H**, células gliales Car-ir (flechas) de la zona subventricular del techo óptico, observándose la arborización glial también Car-ir (cabezas de flecha). Barras de escala = 10 μm (**F**), 25 μm (**C, G, H**), 50 μm (**A, B, D, E**).





Discusión

DISCUSSION



En el presente trabajo se ha estudiado, por primera vez en el cerebro de un teleósteos, la distribución de carnosina y/o péptidos relacionados mediante técnicas inmunohistoquímicas. Los resultados obtenidos demuestran la presencia de este dipéptido fundamentalmente en cuerpos neuronales, resultando asimismo marcadas células gliales. El mismo estudio de localización de carnosina y/o péptidos relacionados fue llevado a cabo en el sistema nervioso central de dos especies de elasmobranquios (*Scyliorhinus canicula* y *Raja clavata*), y en el pez óseo primitivo *Polypterus senegalus* (resultados no publicados), en los cuales también se observó la presencia de este dipéptido fundamentalmente en poblaciones neuronales y fibras nerviosas.

ESPECIFICIDAD DEL ANTICUERPO PRIMARIO

El anticuerpo policlonal anti-carnosina utilizado en este estudio ha sido bien caracterizado en estudios previos, tanto bioquímicos como inmunohistoquímicos (Biffo y col., 1990; Artero y col., 1991a, b). El anticuerpo policlonal empleado fue desarrollado en conejo contra el dipéptido carnosina conjugado con varias proteínas transportadoras (excluyendo BSA), produciendo reacciones cruzadas con la homocarnosina (Biffo y col., 1990). Al preincubar el antisuero primario con un conjugado de carnosina y BSA, u omitir la incubación de las secciones con el anticuerpo primario sustituyéndolo por suero normal, la inmunorreactividad es anulada en su totalidad. Además, los resultados del western blotting indican que este anticuerpo no produce reacciones cruzadas con proteínas naturales en el cerebro del mágil y otras especies de elasmobranquios, como la raya o pintarroja (resultados no publicados).

Por lo tanto, se puede concluir que la inmunorreactividad detectada en este estudio con este anticuerpo, se corresponde a la presencia de carnosina y/o péptidos relacionados con la carnosina tales como homocarnosina o anserina, denominándose aquellas estructuras que presentan inmunorreactividad como estructuras Car-ir.

CARNOSINA Y/O PÉPTIDOS RELACIONADOS EN EL SISTEMA NERVIOSO DE VERTEBRADOS

Los datos previos relativos a la distribución de la carnosina demostraban una localización en la retina y glomérulos olfatorios en gran parte de los vertebrados

estudiados, y por ello se realizaron técnicas inmunohistoquímicas en estas estructuras, tanto en el múgil como en las otras especies de peces estudiados, observándose una ausencia total de inmunorreactividad a la carnosina en el múgil, tanto en los glomérulos olfatorios como en la retina. En un estudio posterior al realizado en el múgil, llevado a cabo en el pez cebra utilizando el mismo anticuerpo (Senut y col., 2009), se observó que la inmunorreactividad a la carnosina y/o péptidos relacionados se concentra de manera específica en neuronas sensoriales y no sensoriales asociadas al sistema olfativo. Asimismo, también se observó una intensa inmunorreactividad en el epitelio de la córnea y en la capa nuclear externa retinal. La expresión de la carnosina en el pez cebra se produce tempranamente y en diferentes estadios de desarrollo (desde las 18 horas hasta los 7 días post-fertilización), observándose estructuras positivas en epitelio y nervio olfatorio, córnea y primordio retinal. La presencia de carnosina en estructuras olfatorias y retinales concuerda con los resultados obtenidos en aves, donde la localización de la carnosina está restringida a neuronas receptoras olfatorias y al nervio olfatorio (Biffò y col., 1990), reptiles, en los que la carnosina se expresa en las vías olfatorias asociada a las neuronas receptoras olfatorias (Artero y col., 1991a, b), rana, en la cual su localización se observó en fotorreceptores, células bipolares, presuntas células amacrinas y ganglionares (Sassoe-Pognetto y col., 1992), y en roedores donde la carnosina está presente en la mucosa olfatoria, bulbo olfatorio y retina (Margolis, 1974; Wideman y col., 1978; Margolis y Grillo, 1984).

En el caso del pez óseo primitivo, *Polypterus senegalus*, y del elasmobranquio *Raja clavata* se ha observado inmunorreactividad a la carnosina en haces de la fila olfatoria, situados en la zona central de la mucosa, así como células en la zona de los pliegues que rodean estos haces. Además, en *Polypterus senegalus* la carnosina está presente en células de las capas celular interna, celular externa y glomerular de los bulbos olfatorios (Lamas y col., 2007b). La localización de la carnosina en los glomérulos olfatorios de estas especies de peces (pez óseo primitivo y elasmobranquio) coincide, en esencia, con lo observado en el pez cebra.

La distribución de la carnosina en poblaciones neuronales, exceptuando los sistemas olfatorios y retinianos, quedó demostrada en un estudio realizado en el anfibio urodelo *Triturus carnifex*, donde se observó que la carnosina se localizaba en varias

poblaciones neuronales del sistema nervioso central (Artero y col., 1991a, b), pero, curiosamente, nunca en neuronas receptoras olfatorias. Esta distribución de la carnosina en el tritón crestado presenta una gran similitud a la distribución observada en el múgil y las dos especies de elasmobranquios estudiados. En la rana, se observó la presencia de carnosina en neuronas sensoriales de los canales semicirculares del oído interno (Panzanelli y col., 1997) y en neuronas receptoras de las crestas ampulares (Panzanelli y col., 1994). En otras especies de vertebrados estos péptidos también se localizan preferentemente en células sensoriales, como las de los órganos de la línea lateral de *Xenopus* (Mroz y Sewell, 1989) o en el nervio sacular de la trucha (Drescher y Drescher, 1991). En el cerebro de rata (De Marchis y col., 2000), se identificaron varias poblaciones positivas en diferentes zonas del encéfalo, y aunque no hay una evidencia constatable de que las células inmunorreactivas a la carnosina se correspondan con neuronas, la distribución tanto de fibras como de células inmunorreactivas es muy similar a la descrita para las bien caracterizadas neuronas migratorias que expresan GnRH (Merchenthaler y col., 1984). En el cerebro de rata se demostró que la expresión de la carnosina aumenta en sucesivas etapas del desarrollo en células gliales de todo el sistema nervioso central (De Marchis y col., 2000). El presente estudio en el múgil demuestra la presencia de la carnosina y/o péptidos relacionados en el estadio adulto, aunque también se observaron diferencias en la distribución de la carnosina en diferentes estadios de desarrollo (resultados no publicados), y de igual manera a lo observado en la rata, en el múgil la expresión de la carnosina aumenta a medida que se produce el desarrollo, pero en el múgil, el aumento de expresión y distribución está relacionado con poblaciones neuronales, y no gliales como ocurre en la rata.

En el anfibio *Rana esculenta*, la carnosina está presente sólo en células gliales (Artero y col., 1991a, b) de manera similar a lo observado en roedores (Biffo y col., 1990), donde la carnosina se encuentra asociada fundamentalmente a células gliales, dispersas tanto en la sustancia gris como en la sustancia blanca, a células endimarias (Bonfanti y col., 1999) y a un tipo particular de astrocitos del cerebelo conocidos como glía de Bergmann (Flament-Durand y Brion, 1985). En roedores, la carnosina está presente en tanicitos que revisten determinadas cavidades ventriculares y en los astrocitos que forman los tubos gliales de la capa subependimaria (Peretto y col., 1998). En estudios realizados *in vivo* en el cerebro de

ratas adultas, quedó demostrada la naturaleza glial de las células inmunopositivas mediante el uso combinado del anticuerpo para la carnosina y diferentes marcadores gliales específicos para astrocitos y oligodendrocitos maduros, observándose estas células gliales Car-ir distribuidas en todo el cerebro (De Marchis y col., 1997). En el múgil, también se ha observado la presencia de carnosina y/o péptidos relacionados en algunas células gliales localizadas en el epéndimo telencefálico y diencefálico, supuestos astrocitos reticulares en el nervio óptico, en capas subependimarias diencefálicas y en el techo óptico y las próximas al núcleo del nervio troclear.

Si se comparan los resultados descritos en otras especies de vertebrados con los resultados obtenidos en este trabajo realizado en el múgil, y en otras especies de peces estudiados (resultados no publicados), pueden apreciarse notables diferencias en relación a la presencia y distribución de carnosina y/o péptidos relacionados. En primer lugar, destacar la abundancia de estos péptidos en numerosos núcleos neuronales así como fibras, todos ellos situados en el encéfalo del múgil y demás especies estudiadas. En segundo lugar, al contrario de la mayoría de vertebrados estudiados, en el múgil y elasmobranquios hay una ausencia de inmunorreactividad en zonas olfatorias y retinianas. Por último, y de manera similar a lo observado en reptiles, anfibios anuros y mamíferos, en el múgil también puede apreciarse la presencia de carnosina en algunas células de naturaleza glial, si bien aparece asociada fundamentalmente a neuronas.

INMUNORREACTIVIDAD A LA CARNOSINA Y/O PÉPTIDOS RELACIONADOS EN POBLACIONES NEURONALES DEL ENCÉFALO DEL MÚGIL

En el cerebro del múgil, la carnosina fue observada principalmente en poblaciones neuronales, colocalizando con el marcador neuronal HuC/D, el cual es expresado por neuronas del sistema nervioso central de varios vertebrados en etapas tempranas del desarrollo (Kim y col., 1996; Okano y Darnell, 1997; Wakamatsu y Weston, 1997; Park y col., 2000; Sueiro y col., 2004). Los resultados en el múgil indican que la HuC/D también se expresa de manera específica en células con apariencia neuronal a lo largo del cerebro adulto, y no en poblaciones gliales, de acuerdo con los resultados de expresión de HuC/D en peces adultos y embriones (Park y col., 2000; Mueller y Wullimann, 2002; Sueiro y col., 2004; Castro y col., 2008; Rodríguez-Moldes y col., 2011; Tapanes-Castillo y col., 2014; Quintana-Urzainqui y col., 2014).

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la carnosina está ampliamente distribuida en el encéfalo del mágil y que aparece mayoritariamente asociada a sistemas neuronales específicos. Asimismo, como no existen otros datos publicados de localización de la carnosina y/o péptidos relacionados en el sistema nervioso central de otras especies de peces, compararemos los resultados del presente estudio con otros que se han realizado (resultados no publicados) en dos especies de elasmobranquios (*Scyliorhinus canicula* y *Raja clavata*), y en el pez óseo primitivo *Polypterus senegalus*.

Telencéfalo.

En el mágil todas las zonas del área dorsal telencefálica, así como los núcleos del área ventral telencefálica, exhiben poblaciones neuronales Car-ir. De manera similar a lo observado en el mágil (Lamas y col., 2007a, ver anexo), en el telencéfalo del pez óseo *Polypterus senegalus* (Lamas y col., 2007b), la presencia de la carnosina se localiza tanto en las zonas del telencéfalo dorsal (palio) P1, parte dorsal y ventral, P2 y P3 como en el telencéfalo ventral (subpalio) donde se observó inmunorreactividad a la carnosina y/o péptidos relacionados en las zonas dorsal, lateral y supracomisural. Mientras que en el mágil y en el pez óseo primitivo, la carnosina se encuentra ampliamente distribuida en diferentes áreas del palio y subpalio, en el caso de los elasmobranquios el marcaje sólo está presente en áreas del subpalio, incluidas zonas adyacentes al fascículo basal telencefálico, tracto tálamocortical de Johnston, núcleo M, tracto del palio y zona ventral de la comisura anterior (pintarroja), y en poblaciones celulares localizadas en el fascículo basal telencefálico, tracto olfatorio y núcleo N de la raya.

Los resultados observados en el telencéfalo de los peces estudiados son similares a los obtenidos en el tritón crestado (Artero y col., 1991b), ya que, alrededor del 80% de las neuronas del palio medial en el tritón (homólogo del telencéfalo dorsal en teleósteos, Broglio y col., 2005), fueron inmunorreactivas a la carnosina, y muchas de ellas estaban presentes en las divisiones laterales y dorsales.

La carnosina y/o péptidos relacionados en el mágil presenta una amplia distribución en poblaciones neuronales del sistema nervioso central con una función todavía desconocida. Mediante estudios de conexiones en otros teleósteos, se demostró que

muchas de las poblaciones neuronales Car-ir están involucradas en ciertas vías tanto sensoriales como motoras, y dichos estudios han permitido proponer posibles funciones de la carnosina en estos sistemas neuronales.

En el área dorsal telencefálica, la zona central (Dc) constituye el origen de la mayor parte de las eferencias telencefálicas en peces actinoptergios (Nieuwenhuys y Meek 1990). Dichas eferencias pueden ascender hacia los bulbos olfatorios o descender a multitud de núcleos diencefálicos y mesencefálicos. Se ha demostrado una importante proyección hacia el techo óptico en diferentes especies de teleósteos, como en *Cyprinus* (Ito y Kishida, 1977; Luiten, 1981), *Carassius* (Grover y Sharma, 1981; Wullimann y Meyer, 1993), *Ictalurus* (Bass, 1981), *Holocentrus* (Ito y Vanegas, 1983), *Gnathonemus* (Wullimann y Northcutt, 1990) y trucha arcoíris (Folgueira y col., 2004b). También se han descrito proyecciones al hipotálamo en *Sebasticus* (Murakami y col., 1983), *Ictalurus* (Kanwal y col., 1988), *Lepomis* (Northcutt y Wullimann, 1988), trucha arcoíris (Folgueira y col., 2004b) y hacia el núcleo preglomeruloso en *Gnathonemus* (Wulliman y Northcutt, 1990) y trucha arcoíris (Folgueira y col., 2004b). En el estudio de las conexiones del telencéfalo de la trucha arcoíris, se demostró que Dc proyecta además hacia el núcleo paracomisural, toro semicircular y tálamo (Folgueira y col., 2004b).

Las aferencias que recibe Dc parten del subpalio y núcleo talámico ventromedial en *Sebasticus* (Murakami y col., 1983; Ito y col., 1986) y de otros núcleos diencefálicos así como núcleos mesencefálicos, tales como el núcleo lateral de la válvula en *Gnathonemus* (Wullimann y Northcutt, 1990), el *locus coeruleus* y núcleos del rafe en *Sebasticus* (Murakami y col., 1983), *Gnathonemus* (Wulliman y Northcutt, 1990) y *Carassius* (Wullimann y Meyer, 1993).

Asimismo, Dc está asociado con las otras zonas del palio presentando conexiones recíprocas con la zona lateral (Dl) y zona medial (Dm) en *Sebasticus* (Murakami y col., 1983), en *Gnathonemus* (Wulliman y Northcutt, 1990), y con Dl y la subdivisión dorsal de la zona lateral (Dld) en la trucha arcoíris (Folgueira y col., 2004b).

Aunque la función general de esta zona sea la de constituir un componente modulador o de salida del palio, es probable que también realice funciones

integradoras en ciertos comportamientos (Demski, 2013). Que la carnosina tenga una función en la neurotransmisión, bien como una sustancia neurotransmisora o neuromoduladora, fue planteada al observar las altas concentraciones de carnosina y/o péptidos relacionados en el sistema olfatorio de varias especies de mamíferos (Margolis, 1974; Neidle y Kander, 1974; Wideman y col., 1978; Burd y col., 1982; Sakai y col., 1987; Biffo y col., 1990), incluyendo la especie humana (Kish y col., 1979; Sakai y col., 1990). En el mágil se observan neuronas Car-ir en Dc así como en la mayoría de las poblaciones neuronales que presentan conexiones con esta zona, por lo que se podría postular, al igual que en el sistema olfatorio, que la carnosina esté implicada en las funciones neuromoduladoras de esta zona del telencéfalo dorsal.

La zona medial del telencéfalo dorsal (Dm) presenta conexiones recíprocas con el núcleo anterior del túbulo en pez gato (Striedter, 1991), con el complejo preglomeruloso en *Carassius* y *Lepomis* (Northcutt y Wullimann, 1988), *Oncorhynchus mykiss* (Folgueira y col., 2004b) y en ciprínidos (Yamamoto e Ito, 2005), y con la subdivisión dorsal de la zona lateral del telencéfalo dorsal (Dld) (Demski, 2013). Las aferencias que recibe esta zona medial proceden del núcleo talámico ventromedial (involucrado en el procesamiento de señales acústicolaterales), zona posterior del telencéfalo dorsal (Dp), y subpalio (*Sebasticus marmoratus*: Murakami y col., 1983, 1986a; Ito y col., 1986; *Carassius auratus*: Onishi, 1987). En la trucha arcoíris, Dm también recibe aferencias desde el núcleo preóptico, núcleo supraquiasmático, núcleo anterior del túbulo, núcleo gustatorio terciario, tubérculo posterior, núcleo superior del rafe, *locus coeruleus*, gris central rombencefálica y formación reticular (Folgueira y col., 2004b). En el mágil se han observado neuronas Car-ir en la zona medial del telencéfalo dorsal, así como en otras poblaciones neuronales que presentan conexiones con esta zona. En concreto, en el núcleo talámico ventromedial se han observado neuronas Car-ir, y ya que esta población está involucrada en el procesamiento de la señal acústico-lateral, la carnosina puede que esté involucrada en cierto modo con los sistemas que participan en la transmisión de esta señal. En teleósteos, junto con Dld, la subdivisión dorsal de la zona medial del telencéfalo dorsal (Dmd) representan el “palio sensorial” no olfatorio y estudios de comportamiento indican que Dmd genera el temor necesario en comportamientos de defensa/escape y controla varios componentes en especies

con comportamientos agresivos y sexuales, tales como el grado de reacción, orden de conducta y aspectos cognitivos sociales. Mientras que la información funcional apoya de manera general la evidencia anatómica de que Dmd es homólogo a la amígdala de tetrápodos, también se plantea que Dmd tenga funciones del tipo sensorial de manera similar al neocortex de mamíferos (Demski, 2013).

La zona dorsal del telencéfalo dorsal (Dd), junto con la subdivisión dorsal de la zona lateral del área telencefálica dorsal (Dld), reciben aferencias contralaterales de estas mismas regiones (Dd y Dld) en trucha arcoíris (Folgueira y col., 2004b) y del telencéfalo ventral (*Sebasticus marmoratus*: Murakami y col., 1983; trucha arcoíris: Folgueira y col., 2004a; gimnótidos: Giassi y col., 2012). Dd recibe igualmente aferencias que provienen del *locus coeruleus*, tálamo ventromedial, núcleo preóptico, núcleo supraquiasmático, , núcleo lateral del túber, lóbulo hipotalámico, núcleo superior del rafe, formación reticular y gris central rombencefálicas (Folgueira y col., 2004b).

En *Lepomis*, la subdivisión dorsal de la zona lateral del telencéfalo dorsal (Dld) recibe señales acústicolaterales desde el núcleo lateral preglomeruloso (Northcutt y Wullimann 1998), y en *Sebasticus* y trucha arcoíris, tanto la subdivisión dorsal como la ventral presentan proyecciones recíprocas con Dc (Murakami y col., 1983; Folgueira y col., 2004b). Algunas de sus proyecciones van hacia el tálamo medial y ciertas regiones hipotalámicas (Folgueira y col., 2004b). Tanto la zona dorsal del área dorsal telencefálica como el núcleo preglomeruloso del mágil presentan neuronas Car-ir y, como lo observado en *lepomis*, ambas poblaciones están relacionadas con la transmisión y/o recepción de señales acústicolaterales, junto con el núcleo talámico ventromedial (también Car-ir), lo cual podría reforzar la hipótesis anteriormente formulada de que la carnosina pueda tener alguna función relacionada con la modulación de estas señales acústicolaterales en estas poblaciones neuronales.

En el mágil se observaron neuronas Car-ir en la zona posterior del telencéfalo dorsal (Dp), así como en los diferentes núcleos y regiones que presentan conexiones con Dp. Una fuente importante de aferencias al área dorsal telencefálica provienen de los bulbos olfatorios, los cuales no sólo proyectan al telencéfalo ventral sino que también lo hacen a Dp (*Serrasalmus*: Ebbeson y Meyer, 1981; *Sebasticus*: Prasada-Rao y Finger, 1984; trucha arcoíris: Folgueira y col., 2004a, b). Además de presentar

conexiones recíprocas con otras zonas telencefálicas tales como Dc y Dm (Nieuwenhuys y Meek, 1990), en *Sebasticus* se observaron aferencias desde el núcleo gustatorio secundario (Yoshimoto y col., 1998), y en trucha arcoíris desde los núcleos subpaliales Vv y Vs, núcleo preóptico y complejo preglomeruloso, además, Dp proyecta hacia regiones hipotalámicas y del tubérculo posterior (Folgueira y col., 2004b).

En el mágil, todas las subdivisiones y zonas del área dorsal telencefálica presentan neuronas Car-ir, si bien en la zona medial (Dm) el número de células Car-ir es menor a lo observado en otras zonas paliales, lo cual podría suponer una herramienta de caracterización de poblaciones neuronales como lo propuesto para la calretinina en determinadas zonas encefálicas del mágil (Díaz-Regueira y Anadón, 2000). Diversos estudios han puesto de manifiesto la utilidad de la calretinina como marcador neuronal, revelando células, tractos y poblaciones neuronales de tipo sensorial. En el mágil, no se han observado células inmunorreactivas a la calretinina (CR-ir) en el área dorsal telencefálica, por lo que, el estudio de localización de la carnosina y/o péptidos relacionados permite realizar un estudio neuroanatómico de las diferentes poblaciones neuronales no descritas en estudios previos en el telencéfalo dorsal.

Dentro del área ventral telencefálica (subpalio), los núcleos ventral y dorsal, Vv y Vd respectivamente, reciben aferencias de los bulbos olfatorios, área dorsal telencefálica y área preóptica, así como de diferentes núcleos diencefálicos (pez cebra: Rink y Wulliman, 2002, 2004; pez eléctrico: Wong, 1997; trucha arcoíris: Folgueira y col., 2004a; esturión: Huesa y col., 2006). También recibe proyecciones del núcleo gustatorio secundario (trucha arcoíris: Folgueira y col., 2004a; esturión: Huesa y col., 2006), gris central y formación reticular (trucha: Folgueira y col., 2004a). En el pez cebra, además, se observaron aferencias procedentes del núcleo entopeduncular (Rink y Wulliman, 2004). Los núcleos ventral y dorsal presentan conexiones recíprocas con el núcleo supracomisural del telencéfalo ventral (Vs) en *Eigenmannia virescens* (Wong, 1997), en pez cebra (Rink y Wulliman, 2002, 2004) y en trucha (Folgueira y col., 2004a). Las proyecciones que parten del subpalio llegan al telencéfalo dorsal en *Sebasticus* (Murakami y col., 1983) y *Danio rerio* (Rink y Wulliman, 2004), la habénula en pez cebra (Rink y Wulliman, 2004), y trucha (Shiga y col., 1985b), núcleos talámicos y área preóptica en pez eléctrico (Wong, 1997), así

como a núcleos diencefálicos que proyectan, a su vez, a Vv en *Sebasticus* (Ito y col., 1986) y en trucha arcoíris (Folgueira y col., 2004a).

Mientras que la calretinina muestra una distribución conservada en el área ventral telencefálica de las diferentes especies de teleósteos estudiadas (Díaz-Regueira y Anadón, 2000; Castro y col., 2003; Castro y col., 2006), los resultados observados para la carnosina en esta región presentan grandes diferencias. Así, mientras que en el pez cebra (Senut y col., 2009) la distribución de la carnosina está ausente en el sistema nervioso central, en las otras especies estudiadas (condrósteo y elasmobranquios) pertenecientes a diferentes subclases, la distribución de la carnosina en el área ventral telencefálica abarca varias poblaciones neuronales al igual que lo observado en el mágil.

Diencefalo

En el mágil la inmunorreactividad a la carnosina está presente, en mayor o menor medida, en todas las subdivisiones del diencefalo. Esta amplia distribución de la carnosina también ha sido observada en el diencefalo de elasmobranquios (resultados no publicados).

Región preóptica

El núcleo preóptico magnocelular está compuesto por neuronas de gran tamaño de naturaleza neuroendocrina (Bradford y Northcutt, 1983) cuya secreción se libera a los vasos sanguíneos de la neurohipófisis (Peter y Fryer, 1983). En las neuronas del núcleo preóptico magnocelular de *Mugil ramada* se ha demostrado la presencia de un péptido, el factor liberador de la hormona del crecimiento (Olivereau y col., 1990). Estas neuronas no sólo proyectan masivamente a la neurohipófisis, sino también a la médula espinal en *Carassius* (Demski y Sloan, 1985; Gregory y Tweedle, 1985; Prasada-Rao y col., 1987), al subpalio en pez cebra (la parte parvocelular, Rink y Wullimann, 2002, 2004), trucha arcoíris (Folgueira y col., 2004b) y esturión (Huesa y col., 2006), al telencéfalo en trucha arcoíris (Folgueira y col., 2004b), al techo óptico en *Ictalurus* (Striedter, 1990b), al núcleo anterior preglomerular en ciprínidos (Yamamoto, 2005) y al complejo preglomeruloso en trucha (Folgueira y col., 2005) y ciprínidos (Yamamoto y col., 2010).

Las aferencias que recibe el núcleo magnocelular provienen del bulbo olfatorio en trucha (Folgueira y col., 2004b) y región supraquiasmática (Bradford y Northcutt, 1983; Northcutt y Wullimann, 1988; Meek, 1990). Además presenta conexiones recíprocas con la formación reticular medial en carpa (Luque, 2008).

En la región preóptica del mágil y pintarroja, se observa inmunorreactividad a la carnosina y/o péptidos relacionados en el núcleo preóptico magnocelular; concretamente en el mágil se observaron neuronas Car-ir en sus dos porciones, parvocelular (rostroventral) y magnocelular (dorsocaudal). Si bien en el mágil la inmunorreactividad a la carnosina está presente en un gran número de neuronas de este núcleo, en el tritón sólo aparecen unas pocas células Car-ir (Artero y col., 1991a, b).

La región preóptica participa en el control del comportamiento sexual y la agresividad (Meek y Nieuwenhuys, 1998), y está relacionada con el hipotálamo periventricular y tuberal, con el que comparte la inclusión del fascículo telencefálico medial (Meek y Nieuwenhuys, 1998). En la trucha arcoíris esta región proyecta al telencéfalo (Folgueira y col., 2004b), concretamente a la zona medial del área telencefálica dorsal (Dm), a la cual se le atribuyen determinadas funciones en el control de comportamientos agresivos y sexuales (Demski, 2013). Ambas áreas parecen estar implicadas en las mismas funciones de control de comportamiento presentando neuronas Car-ir, lo cual puede sugerir la participación de la carnosina en este proceso de control.

Hipotálamo

Dentro del hipotálamo, el núcleo lateral del túber está implicado de forma particular en la regulación neuroendocrina de la adenohipófisis y de la liberación de la hormona del crecimiento (Peter y Fryer, 1983). Las proyecciones extrahipofisiarias terminan en la región preóptica en *Oncorhynchus* (Shiga y col., 1985a) y en el núcleo ventral del área ventral telencefálica (Vv) en la trucha arcoíris (Folgueira y col., 2004a). El núcleo lateral del túber, junto con el núcleo preóptico magnocelular, constituyen los dos centros neurosecretores “por excelencia” del diencéfalo. Ya que ambos núcleos en el mágil y la pintarroja presentan neuronas Car-ir, se podría sugerir el uso de la técnica inmunohistoquímica para localizar carnosina, como una herramienta de

localización de neuronas neurosecretoras en el sistema nervioso de peces teleósteos, pero resulta arriesgado plantear dicha hipótesis dado que el pez cebra no exhibe inmunorreactividad en estos núcleos y no existen datos en otras especies al respecto.

A diferencia de lo observado en los lóbulos hipotalámicos del tritón (Artero y col., 1991b), en el mágil se puede apreciar un neuropilo inmunorreactivo a la carnosina en su parte más rostral, así como neuronas en zonas caudales, situadas en posición lateral y medial a los recesos laterales del núcleo difuso de los lóbulos inferiores. El núcleo de los recesos laterales así como el núcleo del receso posterior presentan una naturaleza catecolaminérgica en el mágil (Gómez-Segade y col., 1989). Tanto en el mágil como en la pintarroja se observaron neuronas Car-ir en ambos núcleos hipotalámicos, así como en el área preóptica, reforzando todavía más, la posible implicación de la carnosina en el proceso de control del comportamiento sexual y agresivo en el cual participan ambas regiones (Demski y Knigge, 1971; Meek y Nieuwenhuys, 1998). Una de las pocas poblaciones neuronales Car-ir observadas en rata localizadas fuera de los bulbos olfatorios (De Marchis y col., 2000), se encuentra en el núcleo hipotalámico medial, al igual que lo observado en elasmobranquios.

Sakamoto e Ito (1982) mostraron que el lóbulo hipotalámico inferior de *Navodon* recibe una importante señal visual del núcleo glomeruloso, debido a que a este núcleo llegan aferencias del pretecho superficial y del núcleo cortical (Wullimann y Meyer, 1990; Wullimann y col., 1991a, b). En el mágil todos estos núcleos presentan neuronas Car-ir; mostrando el núcleo cortical, en particular, una intensa inmunorreactividad a la carnosina. Proyecciones descendentes desde los lóbulos inferiores terminan, en *Cyprinus*, en los núcleos motores de los nervios facial y trigémino (Luiten y Van der Pers, 1977), ambos con neuronas Car-ir en el mágil. Estas conexiones demuestran que esta zona está implicada en una función de alimentación que obviamente requiere de información visual (Demski y Knigge, 1971), en la cual la carnosina, al estar presente en cada uno de estos núcleos, podría funcionar como moduladora de la señal sensorio-motora.

A nivel postquiasmático, se observa inmunorreactividad a la carnosina en el complejo preglomeruloso y en el núcleo glomeruloso, distinguiéndose éste como el núcleo más característico del tubérculo posterior. El complejo preglomeruloso recibe proyecciones del telencéfalo dorsal (concretamente de las zonas dorsal, medial y

central) en *Lepomis* (Northcutt y Wullimann, 1988), de Dm y Vv en trucha arcoíris (Folgueira y col., 2005), del núcleo preóptico (ciprínidos: Yamamoto e Ito, 2005; trucha arcoíris: Folgueira y col., 2005), del estrato periventricular del techo óptico rostral, del tálamo dorsal y del núcleo central del tálamo posterior (Folgueira y col., 2005). En ciprínidos, se observó una aferencia del toro semicircular así como conexiones recíprocas con el núcleo preglomeruloso anterior, zona medial del telencéfalo dorsal, núcleos caudomedial y medial del complejo preglomeruloso lateral y medial, respectivamente (Yamamoto e Ito, 2005). En trucha, los núcleos del complejo preglomeruloso anterior y medial están relacionados con vías ascendentes del tipo acústicolateral, y el núcleo medial junto con el cuerpo mamilar están relacionados con la zona central del telencéfalo dorsal (Dc) y vías viscerogustativas. Las proyecciones del complejo preglomeruloso hacia el telencéfalo dorsal fueron observadas en trucha (Folgueira y col., 2005), ciprínidos (Yamamoto e Ito, 2005), carpín dorado (Northcutt, 2006), gimnótidos (Giassi y col., 2012), al techo óptico en trucha (Folgueira y col., 2005), núcleo anterior del túber y lóbulos hipotalámicos inferiores mediales en ciprínidos (Yamamoto e Ito, 2005). En ciprínidos, se sugirió que el núcleo anterior glomeruloso podría ejercer un control neurohormonal, circadiano, además de influir en funciones auditivas del hipotálamo. En el mágil se observó neuronas Car-ir en los núcleos lateral y medial del complejo preglomeruloso, en la subdivisión dorsal de la zona lateral del telencéfalo dorsal (Dld) y en la zona central del telencéfalo dorsal (Dc), relacionadas con vías acústicolaterales y viscerogustativas, respectivamente, por lo que la carnosina podría estar implicada realizando en dichas modalidades sensoriales algún tipo de función en estos sistemas neuronales.

Tálamo

En teleósteos, así como en otros vertebrados, tanto el tálamo dorsal como el tálamo ventral están relacionados con la integración de impulsos sensoriales hacia el telencéfalo y particularmente con el sistema visual. El tálamo dorsal y ventral tienen conexiones recíprocas con los núcleos subpaliales dorsal y ventral (Vd y Vv) en el pez cebra (Rink y Wulliman, 2002, 2004); ambos núcleos proyectan a la formación reticular mesencefálica en el carpín dorado (Luque y col., 2008). El tálamo dorsal proyecta al complejo preglomeruloso en la trucha arcoíris (Folgueira y col., 2005). El

tálamo ventromedial en *Sebasticus marmoratus* recibe aferencias de la zona central del telencéfalo dorsal (Dc), del techo óptico, toro semicircular, cuerpo cerebeloso, núcleo del nervio trigémino y formación reticular, y proyecta hacia el telencéfalo dorsal (Dc, Dd y Dm), núcleo supracomisural del telencéfalo ventral (Vs), núcleo talámico dorsomedial, techo óptico, toro semicircular (ciprínidos: Yamamoto y col., 2010) y núcleo lateral de la válvula (Ito y col., 1986), considerándosele como un complejo multimodal que contiene células que podrían constituir el tálamo dorsal en otros grupos de vertebrados. Tanto en el mágil como en la raya, se han observado neuronas Car-ir en el núcleo talámico ventromedial, aunque en el mágil la inmunorreactividad a la carnosina también está presente en el núcleo talámico dorsomedial, así como en el complejo pregglomeruloso, posiblemente relacionado en el mágil, con las vías por donde transcurren los estímulos acústicolaterales.

Epitálamo

De manera similar a otros vertebrados, las habénulas proyectan hacia el núcleo interpeduncular a través del fascículo retroflexo (*Carassius*: Villani y col., 1991; trucha arcoíris: (Yáñez y Anadón, 1996), además en trucha se comprobó una proyección a la gris central rombencefálica (Yáñez y Anadón, 1996). Las aferencias hacia las habénulas de los teleósteos llegan principalmente desde el telencéfalo ventral (Shiga y col., 1985a; Rink y Wulliman, 2004), núcleo entopeduncular, núcleo preóptico en trucha (Yáñez y col., 1996) y órgano pineal (lampreas: Yáñez y col., 1999). En las habénulas del mágil la inmunorreactividad a la carnosina se observa en numerosos terminales de fibras muy delgadas que se corresponderán probablemente a fibras que llegan del núcleo entopeduncular, así como en algunas neuronas de pequeño tamaño situadas en las zonas dorsal y ventral habenulares; por el contrario en pintarroja se las neuronas Car-ir se encuentran situadas en la zona medial habenular.

En el área pretectal del mágil se observan células inmunorreactivas a la carnosina en el núcleo pretectal superficial parvocelular y núcleo pretectal paracomisural. El núcleo pretectal parvocelular, en la mayoría de los teleósteos, representa una zona de transmisión del impulso visual hipotalámico (Northcutt y Wullimann, 1988). En una gran variedad de especies de teleósteos fueron demostrados impulsos de la retina y del techo óptico hacia la parte parvocelular. Además, en trucha recibe proyecciones

del núcleo del istmo (Folgueira y col., 2006), y en concreto el núcleo pretectal paracomisural tiene conexiones recíprocas con el cerebelo en esta misma especie. Respecto a las proyecciones eferentes se ha descrito que el núcleo parvocelular superficial proyecta hacia el núcleo glomeruloso, el cual proyecta, a su vez, hacia los lóbulos hipotalámicos inferiores (Wullimann y Meyer, 1990; Wullimann y col., 1991b). La presencia de carnosina en estos núcleos implicados en una vía de transmisión visual, evidenciaría la implicación de este dipéptido en algún tipo de función dentro de la misma.

Mesencéfalo

Techo óptico

El techo óptico es el centro visual y visuomotor por excelencia en teleósteos, pero también recibe fibras desde una gran variedad de regiones cerebrales (ver Meek y Nieuwenhuys, 1988). El techo óptico del múgil contiene una gran variedad de células inmunorreactivas a la carnosina y/o péptidos relacionados de naturaleza neuronal. Estas células están localizadas en varios estratos del techo óptico: en el estrato periventricular, en el estrato blanco central, en el estrato fibroso y gris superficial y en el estrato óptico. En pintarroja, se observaron células inmunorreactivas a la carnosina en el estrato celular interno, así como en el estrato periventricular, a diferencia de los resultados observados en raya donde la distribución de la carnosina abarca los estratos medular externo, y en las zonas externa e interna del estrato celular externo.

La presencia de neuronas Car-ir en varios estratos del techo óptico del múgil sugiere que estas neuronas están involucradas en “muchos” aspectos de la función visual. Las células Car-ir similares a las del tipo XII de Meek que se encuentran localizadas en la parte superficial del estrato blanco central reciben impulsos visuales (Meek, 1981a, b; Niida y col., 1989). Las células XII de Meek envían axones hacia el toro semicircular (Grover y Sharma, 1981; Ito y col., 1986) y también hacia el rombencéfalo (Niida y Ohno, 1984; Niida y col., 1989). Las células observadas en el estrato óptico extienden sus dendritas hacia las tres subcapas del estrato gris central y son similares a las neuronas tipo XIII de Meek presentes en el estrato blanco central. Las neuronas tipo XIII de Meek envían dendritas a las capas más superficiales y

podrían proyectar a centros fuera del techo óptico, tales como el núcleo pretectal superficial parvocelular (Murakami y col., 1986b).

El toro longitudinal es una estructura exclusiva de peces actinoptergios y está relacionada con el techo óptico. Sus neuronas envían fibras delgadas (paralelas) al estrato más superficial del techo óptico, el estrato marginal, así como las células localizadas en el estrato gris central proyectan al toro longitudinal (Ito y Kishida, 1978; Wullimann, 1994; Wullimann y Roth, 1994; Ito y col., 2003; Xue y col., 2003). La presencia de un gran número de fibras Car-ir, así como neuronas Car-ir en el estrato gris central del múgil, sugiere que las células del toro longitudinal son neuronas con proyecciones toro-tectales. La implicación que pueda tener la carnosina y/o péptidos relacionados en estas neuronas toro-tectales todavía no se conoce. El toro longitudinal también recibe aferencias del núcleo oculomotor (Northmore, 1984; Northmore y col., 1983; Ito y col., 2003; Xue y col., 2003), y puede que esté implicado en la integración funcional de los sistemas visual y de la línea lateral, coordinando los movimientos oculares y corporales (Guthrie, 1990; Meek, 1992). Diversos estudios comparativos han demostrado que las proyecciones toro-tectales están presentes especialmente en teleósteos que viven en aguas turbulentas o que nadan activamente desde la superficie hasta zonas más profundas (Kishida, 1979).

En el múgil se han observado neuronas que presentan una intensa inmunorreactividad a la carnosina situadas en el núcleo cortical de Fritzsche (1878). Este núcleo es una estructura localizada bajo el techo rostral en algunos teleósteos avanzados, incluyendo al múgil (Gómez Segade y Anadón, 1988; Sakamoto e Ito, 1982; Butler y col., 1991; presentes resultados). Este núcleo es atravesado por fibras procedentes de la retina (Ebbesson e Ito, 1980) y aunque no se disponen de resultados en el múgil al respecto de que ciertas fibras retinianas establezcan contacto con las células del núcleo cortical, se ha demostrado la existencia de un plexo terminal denso de fibras retinianas en *Clupea* (Northcutt y Butler, 1993) además del registro de la respuesta visual intracelularmente en *Ambloplites* (Rowe y Bauchamps, 1982). Este núcleo cortical envía fibras al cuerpo glomeruloso (núcleo rotundo de Fritzsche, 1878) en *Navodon* (Sakamoto e Ito, 1982). El núcleo cortical del múgil se puede identificar de manera sencilla debido a su intensa inmunorreactividad a la carnosina, pero las posibles funciones de este núcleo, así como las funciones de

la carnosina en el mismo, se quedan en meras especulaciones.

Tegmento mesencefálico

En el tegmento mesencefálico del múgil se observa una fuerte inmunorreactividad a la carnosina en diferentes agrupaciones de neuronas, tales como el núcleo del fascículo longitudinal medial, núcleo mesencefálico del nervio trigémino, toro semicircular, núcleo oculomotor y núcleo troclear. En elasmobranquios (pintarroja y raya) se aprecia una distribución similar, si bien en el múgil también aparecen neuronas Car-ir en el núcleo lateral de la válvula, núcleo interpeduncular, núcleo del istmo, núcleo gustatorio secundario, *locus coeruleus* y núcleos del rafe.

El núcleo del fascículo longitudinal medial proyecta hacia la médula espinal a través del fascículo longitudinal medial, el cual, no obstante, también contiene otros componentes como eferencias reticulares y vestibulares además de axones que conectan diferentes núcleos oculomotores. En ciprínidos se comprobó que este núcleo presenta proyecciones hacia la válvula cerebelosa rostral (Ito y Yoshimoto, 1990) y en *Carassius* hacia el núcleo oculomotor (Torres y col., 1992). Además, en el carpín dorado se demostraron movimientos natatorios ficticios al electroestimular dicho núcleo (Fetcho y Svoboda, 1993). Tanto en el múgil como en la pintarroja las neuronas del núcleo del fascículo longitudinal medial y del núcleo oculomotor exhiben inmunorreactividad a la carnosina, pudiéndose relacionar a este dipéptido con la modulación de señales motoras.

El núcleo del nervio oculomotor recibe aferencias desde el cuerpo cerebeloso (Murakami y Morita, 1987; Wullimann y Northcutt, 1988), las eminencias granulares del cerebelo y la formación reticular rombencefálica (Torres y col., 1992). Además, el núcleo oculomotor tiene conexiones recíprocas con el núcleo motor del nervio abducente (Allum y col., 1981; Cabrera y col., 1991; Torres y col., 1992).

Las neuronas inmunorreactivas a la carnosina presentes en el núcleo del nervio troclear se disponen dorsal y lateralmente al fascículo longitudinal medial. En *Pseudopleuronectes*, las neuronas de este núcleo reciben una importante proyección ascendente vestibular a través del fascículo longitudinal medial (Graf y Baker, 1985). Las motoneuronas trocleares están relacionadas funcionalmente con las neuronas oculomotoras, entremezclando sus dendritas con estas últimas (Szabo y col., 1987).

Tanto el núcleo del nervio oculomotor como el núcleo del nervio troclear presentan neuronas y fibras Car-ir, y ambos núcleos están implicados en la innervación de varios músculos del ojo. La distribución de la carnosina en diversos núcleos tegmentales mesencefálicos del mágil recuerda a la calretinina en dicha especie (Díaz-Regueira y Anadón, 2000). Además, se observaron fibras calretinina positivas en el músculo recto superior del ojo (resultados no publicados). Aunque no se han realizado estudios para determinar la presencia de la carnosina en otras zonas extraencefálicas, posiblemente la carnosina presente en los núcleos tegmentales troclear y oculomotor podría estar relacionada con la transmisión de la señales de tipo motor hacia los músculos oculares.

El toro semicircular del mágil presenta células inmunorreactivas a la carnosina y/o péptidos relacionados en posiciones centrales. Los estudios realizados en elasmobranquios revelan sólo la presencia de células Car-ir en la raya. El toro semicircular recibe aferencias del palio en *Sebasticus marmoratus* (Murakami y col., 1983), de la zona central del telencéfalo dorsal (Dc) en trucha (Folgueira y col., 2004b) y en ciprínidos (Yamamoto y col., 2010), conexiones recíprocas con el núcleo ventral del telencéfalo ventral (Vv) en trucha (Folgueira y col., 2004a), núcleo talámico ventromedial en *Sebasticus marmoratus* (Ito y col., 1986) y en ciprínidos (Yamamoto y col., 2010), además del núcleo sensorial del nervio trigémino y área octavolateral rombencefálica (Yamamoto y col., 2010). Las proyecciones del toro semicircular llegan al complejo preglomeruloso en ciprínidos (Yamamoto e Ito, 2005; Yamamoto y col., 2010), núcleo lateral de la válvula en tilapia (Yang y col., 2004) y válvula cerebelosa en trucha arcoíris (Folgueira y col., 2006). El toro semicircular es un centro multisensorial principalmente relacionado con el sistema octavolateral (Knudsen, 1977; Finger y Tong, 1984). En el mágil, los núcleos laterales y mediales del toro semicircular son inmunorreactivos a la calretinina (Díaz-Regueira y Anadón, 2000), mientras que sólo el núcleo medial es Car-ir. En otros teleósteos el núcleo lateral recibe señales de la línea lateral de tipo mecanosensorial sugiriendo que las neuronas calretinina positivas están relacionadas con esta modalidad sensorial y, del mismo modo, se demostró en el carpín dorado (Echteler, 1985) que el núcleo medial está relacionado con el estímulo acústico, por lo que se podrían asociar las neuronas Car-ir presentes en este núcleo medial con esta modalidad sensorial, algo que se ha planteado anteriormente para diferentes núcleos

Car-ir relacionados con el estímulo acústicolateral.

Las pequeñas células del núcleo lateral de la válvula proyectan hacia el cuerpo y válvula cerebelosos y al toro longitudinal en varios teleósteos (Finger, 1978a, 1983b; Meek y col., 1986a, b; Wullimann y Northcutt, 1988, 1989; Uchiyama y col., 1988; Ito y Yoshimoto, 1990; Wullimann y Meyer, 1993; Yang y col., 2004) y contralateralmente hacia el toro longitudinal (Meek y col., 1986b; Ito y Yoshimoto, 1990; Wullimann y Roth, 1994; Wullimann, 1994). Las aferencias del núcleo lateral de la válvula de la carpa se originan en el lóbulo hipotalámico inferior (señales de tipo gustativo), en el núcleo talámico ventromedial y en el núcleo pretectal superficial magnocelular (ambos relacionados con señales de tipo visual) (Ito y Yoshimoto, 1990). En tilapia, tras la aplicación de trazadores en el núcleo lateral de la válvula, se observaron células marcadas en la zona dorsal del telencéfalo dorsal (Dd), subdivisión dorsal de la zona medial del telencéfalo dorsal (Dmd), núcleo talámico dorsomedial, habénula, y núcleos anterior y posterior del túber (Yang y col., 2004). En el mágil, se observó la presencia de numerosas fibras y terminales sinápticos Car-ir en el toro longitudinal, algunas de ellas pueden proceder del núcleo preglomeruloso (relacionado con señales acústicolaterales), o bien del núcleo lateral de la válvula (relacionado con señales tanto gustativas como visuales). Probablemente, los terminales sinápticos observados puedan proceder de ambos núcleos, dada la función integradora visual-motora sugerida para el toro longitudinal (Northmore y col., 1983; Northmore, 1984; Guthrie, 1990).

Otro de los núcleos tegmentales del mágil en los que se ha observado marcaje para la carnosina y/o péptidos relacionados es el núcleo interpeduncular, denominado así por su posición entre los pedúnculos cerebrales en mamíferos. Aunque en vertebrados no mamíferos no existen tales pedúnculos, el núcleo homólogo es conocido por el mismo nombre. Este núcleo recibe aferencias específicas desde las habénulas por medio del fascículo retroflexo (Nieuwenhuys y Pouwels, 1983; Villani y col., 1987, 1994a, b; Yáñez y Anadón, 1996) y del subpalio en pez cebra (Rink y Wullimann, 2004). En mágil, las neuronas de este núcleo están cubiertas por numerosos botones sinápticos, presumiblemente correspondientes a fibras del fascículo retroflexo.

Rombencéfalo

Región del istmo

En la región del istmo se observó inmunorreactividad a la carnosina en neuronas situadas ventrolateralmente al núcleo lateral de la válvula, los cuales podrían considerarse pertenecientes a un núcleo del istmo en el múgil. Esta región incluye los núcleos gustatorios secundarios, el núcleo pre-eminencial y el núcleo del istmo tectal (visual), el cual está bien desarrollado en especialistas visuales como *Navodon*. Aunque la región del istmo está considerada como una parte del rombencéfalo (Nieuwenhuys y Pouwels, 1983), alguno de los núcleos mencionados anteriormente, tales como el núcleo pre-eminencial y el núcleo del istmo (visual), son considerados como núcleos mesencefálicos (Vanegas e Ito, 1983; Bell y Szabo, 1986; Carr y Maler, 1986). En el múgil se observaron neuronas Car-ir en el núcleo gustatorio secundario, el cual recibe aferencias de centros gustatorios primarios. En ciprínidos, el núcleo gustatorio secundario presenta una cierta organización somatotópica en tres zonas (Morita y col., 1983): una zona medial, que reciben proyecciones del lóbulo facial y proyecta al núcleo glomeruloso y al núcleo difuso de los lóbulos hipotalámicos inferiores, una zona intermedia que recibe entradas del lóbulo glossofaríngeo y proyecta al diencefalo medio, y una zona lateral que recibe aferencias del lóbulo vagal y proyecta a regiones rostrales del diencefalo.

El *locus coeruleus* presenta conexiones recíprocas con el núcleo ventral del telencéfalo ventral (Vv) en trucha (Folgueira y col., 2004a) y proyecta a áreas del telencéfalo dorsal en *Sebasticus marmoratus* (Murakami y col., 1983) y trucha (Folgueira y col., 2004b) y al telencéfalo ventral en pez cebra (Rink y Wulliman, 2004). Los estudios realizados en el pez cebra con trazadores (Ma, 1994) revelaron proyecciones al bulbo olfatorio, a la subdivisión dorsal de la zona medial del telencéfalo dorsal, al complejo habenular, al núcleo del rafe, al núcleo interpeduncular, al toro semicircular, al hipotálamo, a áreas supraquiasmáticas y preópticas, al toro longitudinal, al techo óptico y al cerebelo. En el múgil, tanto el núcleo gustatorio secundario como el *locus coeruleus* son estructuras que presentan inmunorreactividad a la carnosina así como a la calretinina (Díaz-Regueira y Anadón, 2000), esta última normalmente presente en neuronas sensoriales primarias y algunas secundarias, si bien la posible colocalización de ambas sustancias no ha

sido probada. Los resultados de expresión obtenidos para la carnosina en ciertos núcleos y regiones del encéfalo del mágil revelan la utilidad de este dipéptido como marcador para estudios neuroanatómicos y/o citoarquitectónicos.

Los núcleos del rafe son agrupaciones de neuronas que se caracterizan por presentar células serotoninérgicas (Ekström y Van-Veen, 1984; Ekström y Ebbesson, 1989; Meek y col., 1989; Johnston y col., 1990) y se encuentran situadas en la región medial del rombencéfalo y cerebro medio. Algunos de estos núcleos están en el bulbo raquídeo y otros pertenecen al mesencéfalo. Las neuronas del núcleo superior del rafe están situadas, en el caso del mágil, en el tegmento mesencefálico en posición medial al fascículo longitudinal medial, y muestran una inmunorreactividad moderada a la carnosina. En general, todas las neuronas del rafe presentan gruesas prolongaciones orientadas radialmente que penetran en la formación reticular. Las proyecciones de las neuronas del rafe pueden ser muy extensas, alcanzando prácticamente todas las regiones del cerebro (a excepción del cerebelo) y la médula espinal (Ekström y Van-Veen, 1984; Cohen y Kriebel, 1989; Meek y col., 1989; Gotow y col., 1990; Johnston y col., 1990; Batten y col., 1993).

Cerebelo

El cerebelo del mágil presenta una intensa inmunorreactividad a la carnosina en las diferentes capas (ganglionar, molecular y granular) de las tres porciones cerebelosas distinguibles en el mismo. Resultados similares pudieron observarse en raya y pintarroja, aunque, a diferencia del mágil, no fueron identificadas células Car-ir en la capa molecular cerebelosa (Lamas y col., 2010). Artero y col. (1991b) observaron la presencia de carnosina en las células de Purkinje del tritón, aunque el patrón de distribución de la carnosina en el mágil y los elasmobranquios es mucho más amplio que el exhibido por el tritón.

La capa de las células de Purkinje suele denominarse capa ganglionar porque en peces actinoptergios existe, además, otro tipo de células, las neuronas euridendroides (Nieuwenhuys y col., 1974; Pouwels, 1978c; Finger, 1978b, 1983a; Meek y col., 1986a, b; Murakami y Morita, 1987; Ito y Yoshimoto, 1990; Díaz-Regueira y Anadón, 2000; Miyamura y Nakayasu, 2001). Aunque sigue siendo objeto de debate, se considera que las células euridendroides no son células de

Purkinje modificadas (Alonso y col., 1992; Meek y col., 1992) sino que más bien se trata de otro tipo celular diferente (Finger, 1983; Murakami y Morita, 1987a). La diferenciación entre estos dos tipos neuronales se fundamenta en la presencia de espinas sobre sus dendritas, inmunonegativas a la carnosina. Cuando se compara la distribución de la carnosina con la presentada en el múgil por la calretinina y parvalbúmina, se aprecia que las células Car-ir se corresponden con células de Purkinje, aunque es probable que ambos tipos de neuronas (células de Purkinje y eurdendroides) contengan carnosina. El cuerpo cerebeloso proyecta desde las células eurdendroides periféricas hacia las regiones talámicas ventrolateral y ventromedial, el núcleo óptico accesorio ventral, las regiones ventrolaterales del techo óptico y del toro semicircular, la válvula rostral cerebelosa, el núcleo del nervio oculomotor, la formación reticular mesencefálica, el núcleo del fascículo longitudinal medial, la región más dorsal del lóbulo hipotalámico inferior y la formación reticular superior e inferior (Wullimann y Northcutt, 1988). Las células Car-ir del techo óptico y del cerebelo muestran relaciones con numerosas poblaciones neuronales pertenecientes a las principales subdivisiones involucradas en circuitos específicos, por lo que los resultados observados en el múgil son coherentes con la función propuesta para la carnosina como neurotransmisor o neuromodulador.

Bulbo raquídeo

En el bulbo raquídeo del múgil se han observado fibras y neuronas Car-ir en varios núcleos motores y sensitivos de los principales nervios, así como en el área de la línea lateral, núcleos reticulares y región caudal de la columna viscerosensorial. El patrón de distribución de la carnosina en la *medulla oblongata* de elasmobranquios recuerda al presentado por el múgil, lo cual resulta interesante, ya que en ninguna otra especie de vertebrados se observó la presencia de carnosina en poblaciones neuronales de carácter motor.

El núcleo motor del nervio trigémino es el núcleo visceromotor más rostral del bulbo raquídeo. Se puede subdividir en una zona anterior y otra zona caudal, que representan la parte motora del nervio trigémino, observándose en ambas zonas neuronas inmunorreactivas a la carnosina, tanto en múgil como en elasmobranquios. La subdivisión rostral o anterior inerva el músculo aductor ipsilateral de la mandíbula, mientras que la subdivisión caudal proyecta hacia los músculos

abductores ipsilaterales de la mandíbula (Luiten, 1976; Gorlick, 1989). Las aferencias hacia el núcleo motor del trigémino se originan predominantemente en los núcleos reticulares superior, medial e inferior, los lóbulos hipotalámicos inferiores, el complejo preglomeruloso diencefálico (Luiten y van der Pers, 1977) y la médula espinal (Oka y col., 1986b). El núcleo motor del trigémino también tiene conexiones con su parte equivalente contralateral, con el núcleo del nervio oculomotor y el núcleo motor del nervio facial, tanto ipsi- como contralaterales (Luiten y van der Pers, 1977). Las motoneuronas del trigémino juegan un papel importante en la generación de movimientos respiratorios (Bamford, 1974; Ballintijn y Alink, 1977; Ballintijn y col., 1983).

En el múgil no es fácil identificar el núcleo sensitivo del nervio trigémino, sin embargo, se observa una agrupación de neuronas inmunorreactivas a la carnosina que, dada su posición (dorsolaterales a la entrada de la raíz sensitiva), podría tratarse, al menos en parte, del núcleo sensitivo. Los impulsos aferentes hacia el núcleo descendente del trigémino llegan, en el caso de *Carassius*, desde el lóbulo facial (Morita y col., 1980, 1983). Las proyecciones eferentes desde los núcleos sensoriales terminan predominantemente en los núcleos motores de los nervios facial y trigémino (Luiten y van der Pers, 1977). En el carpín dorado, el núcleo sensitivo rostral del trigémino también proyecta al núcleo lateral de la válvula (Wullimann y Northcutt, 1989).

Como ocurre en amniotas, la porción sensitiva del nervio trigémino de teleósteos, y en concreto del múgil, también está relacionada con otro núcleo formado por unas cuantas neuronas redondeadas o piriformes que se colocan dorsalmente en el tegmento mesencefálico. Dichas neuronas, inmunorreactivas a la carnosina en el múgil, forman el núcleo mesencefálico del nervio trigémino. Este núcleo ha sido identificado por algunos autores en peces actinoptergios, pero como observan Niewenhuys y Pouwels (1983), en todos estos peces se sitúa en el techo óptico, salvo en teleósteos que se disponen en el tegmento, como ocurre en el múgil. Este núcleo parece estar relacionado con funciones mecanorreceptivas de la zona peri-oral, al menos en *Cyprinus* (Luiten, 1979).

El núcleo motor del nervio abducente contiene varias poblaciones neuronales inmunorreactivas a la carnosina localizadas en dos subnúcleos, uno rostral y otro

caudal. Estos subnúcleos han sido descritos en diversos teleósteos (Sterling, 1977; Gestrin y Sterling, 1977; Allum y col., 1981). El subnúcleo rostral recibe, sobre todo, aferencias desde varios núcleos vestibulares y el tegmento mesencefálico dorsal, mientras que las aferencias del subnúcleo caudal proceden predominantemente del núcleo reticular medio, además del subnúcleo rostral (Allum y col., 1981).

Los núcleos motores de los nervios glosofaríngeo, facial y vago forman una columna más o menos continua en algunos teleósteos, pero en el múgil estos núcleos motores aparecen claramente separados. En el múgil, el núcleo motor del nervio facial contiene neuronas inmunorreactivas a la carnosina y/o péptidos relacionados y las aferencias hacia este núcleo son similares a las del núcleo motor del nervio trigémino, pero además presenta conexiones (axónicas o dendríticas) con motoneuronas de los núcleos de los nervios glosofaríngeo y vago (Luiten y van der Pers, 1977). De manera similar a las motoneuronas del trigémino, las motoneuronas del nervio facial intervienen en los movimientos respiratorios (Bamford, 1974; Ballintijn y Alink, 1977; Ballintijn y col., 1983; Gorlick, 1989).

En muchos teleósteos la separación entre los núcleos de los nervios glosofaríngeo y facial no está del todo clara aunque en el múgil ambas poblaciones neuronales han sido identificadas como poblaciones Car-ir. Asimismo, parece existir una cooperación funcional entre ambas poblaciones ya que parte de las motoneuronas del nervio glosofaríngeo participan en la inervación de los músculos operculares que predominantemente están inervados por el nervio facial (Gorlick, 1989).

Las motoneuronas del nervio vago que presentan inmunorreactividad a la carnosina en el múgil se sitúan lateralmente al cuarto ventrículo. Estas neuronas corresponderían a la parte visceromotora o branquiomotora del nervio vago que inerva los músculos perifaríngeos localizados en posición caudal al primer arco branquial en el múgil (Díaz-Regueira y Anadón 1992) y en otros teleósteos (Kanwal y Caprio, 1987; Morita y Finger, 1987b; Lazár y col., 1992). Los estudios realizados con trazadores han mostrado que, en *Carassius*, las aferencias provienen del lóbulo vago y de la parte lateral del núcleo general viscerosensorial (Morita y Finger, 1985b; Goehler y Finger, 1992), del núcleo motor facial en *Cyprinus* (Luiten y van der Pers, 1977), y de la médula espinal en *Oncorhynchus* (Oka y col., 1986b). Asimismo, se observaron células intensamente inmunorreactivas a la carnosina en el

ganglio del vago, apareciendo también marcada la raíz sensorial del vago y zonas de la columna viscerosensorial. En el múgil, el empleo de anticuerpos contra la calretinina permitió revelar las células sensoriales de los botones gustativos (Díaz-Regueira y col., 2005; ver anexo II), así como estructuras viscerosensoriales periféricas y centrales, incluidas células ganglionares vagales, algunas células del lóbulo vagal y las que forman parte del núcleo gustatorio secundario (Díaz-Regueira y Anadón, 2000; Díaz-Regueira y col., 2005; ver anexo II). A pesar de los estudios realizados y los resultados obtenidos, la posible relación entre la carnosina y la calretinina en estas estructuras no ha sido abordada, ni la implicación de la carnosina en el sistema gustativo de peces.

Las neuronas del núcleo vestibular magnocelular y del núcleo tangencial, dos poblaciones relacionadas con el nervio VIII o vestibular, son inmunorreactivas a la carnosina. Estudios realizados con HRP (peroxidasa de rábano) han mostrado que, en el múgil, el núcleo vestibular magnocelular recibe aferencias de la rama anterior del nervio VIII (Díaz-Regueira y Anadón, 1990), así como de los nervios de la línea lateral (Díaz-Regueira y Anadón, 1989). Resultados similares han sido descritos en otros teleósteos (Bell, 1981a, b; McCormick, 1983; Meredith, 1985, 1988; Finger y Tong, 1984; Meredith y col., 1987; McCormick y Braford, 1993, 1994). Por su parte, las eferencias de este núcleo alcanzan la médula espinal (Hlavacek y col., 1984).

El núcleo tangencial del múgil recibe aferencias de la rama anterior del nervio VIII, y las neuronas de este núcleo emiten axones que cruzan la línea media para formar una comisura ventral y descendente denominada clásicamente como *tracto octavo motorius cruciatus*. Estas fibras emiten colaterales hacia las neuronas del núcleo del nervio abducente con las que establecen conexión (Díaz-Regueira y Anadón, 1990). En otros teleósteos se han demostrado proyecciones de las neuronas del núcleo tangencial hacia el núcleo del nervio oculomotor a través del fascículo longitudinal medial (Graf y Baker 1985; Torres y col., 1992) y hacia la médula espinal (Bell, 1981a, b; Hlavcek y col., 1984; Meredith y col., 1987; Prasada-Rao y col., 1987, 1993a; Behrend y Donicht, 1990).

La zona dorsal del bulbo raquídeo, bajo las crestas cerebelosas, es el lugar donde proyectan los nervios de la línea lateral. Estos nervios conducen impulsos que, en los teleósteos no electrorreceptivos, proceden de los neuromastos, órganos

mecanorreceptores situados a lo largo de la línea lateral del cuerpo y la cabeza. En el área lateral del mágil, teleósteo no electrorreceptivo, se han descrito dos tipos de células: las células de la cresta, de aspecto fusiforme y las células ovales, de menor tamaño y soma ovalado (Díaz-Regueira y Anadón, 1989, 1995). Ninguna de estas neuronas son inmunorreactivas a la carnosina, pero las células de la cresta tienen dendritas apicales que se introducen y ramifican en las crestas cerebelosas, sobre las cuales se observan numerosos botones sinápticos inmunorreactivos a la carnosina. Mediante microscopía electrónica se han identificado terminales presinápticos que forman sinapsis simétricas y asimétricas sobre las dendritas de las células de la cresta (Díaz-Regueira y Anadón, 1995). Posiblemente, los botones sinápticos Car-ir presentes en las células de la cresta se correspondan con terminales nerviosos de los nervios de la línea lateral, evidenciando algún tipo de relación de la carnosina con señales sensoriales mecanorreceptoras.

La formación reticular es una región poco diferenciada situada en la zona ventral e intermedio-ventral del bulbo raquídeo; está constituida por agrupaciones de neuronas multipolares cuyas prolongaciones forman una especie de red que da lugar a sistemas de fibras ascendentes y descendentes. En el mágil, la inmunorreactividad a la carnosina se localiza en los núcleos reticulares superior, medial e inferior. Las aferencias más importantes hacia la formación reticular incluyen las procedentes de la médula espinal (Hayle, 1973; Murakami e Ito, 1985; Oka y col., 1986a), el techo óptico (Ebbesson y Vanegas, 1976; Sligar y Voneida, 1976; Grover y Sharma, 1979, 1981; Luiten, 1981) y el cerebelo (Finger 1978b, 1983b; Meek y col., 1986a, b; Wullimann y Northcutt, 1988). Las proyecciones eferentes más importantes desde el núcleo reticular medial son hacia la médula espinal (Hlavacek y col., 1984; Oka y col., 1986a; Prasada-Rao y col., 1987; Roberts, 1992) y hacia los núcleos motores de los nervios V y VII (Luiten y van der Pers, 1977). Además, el núcleo reticular superior proyecta hacia el techo mesencefálico (Grover y Sharma, 1981; Luiten, 1981), y el núcleo reticular medio lo hace hacia el núcleo del nervio oculomotor (Torres y col., 1992), al núcleo del nervio abducente (Allum y col., 1981) y al lóbulo del nervio facial (Morita y Finger, 1985a). Los resultados observados en relación a la presencia de neuronas Car-ir en los distintos núcleos reticulares, así como en los núcleos motores hacia donde proyectan estas neuronas, demuestran, en cierta medida, la posible implicación de la carnosina en los sistemas motores

rombencefálicos.

Las neuronas de Mauthner son un par de neuronas gigantes que han sido identificadas en un gran número de teleósteos y anfibios acuáticos y se las considera como parte del núcleo reticular medial. En el caso del múgil poseen un axón bastante grueso que sale de la célula dorsalmente, observándose en la zona de emergencia del axón fibras gruesas y finas que proceden del fascículo longitudinal medial y de una comisura subventricular y que forman un entramado denominado *axon cap* (Díaz-Regueira, 1987). Aunque el soma de las neuronas es inmunonegativo, el *axon cap* presenta inmunorreactividad a la carnosina. El axón gigante de la célula de Mauthner desciende de manera contralateral hacia la médula espinal, donde por medio de cortas colaterales establece contacto con motoneuronas primarias y varios tipos de interneuronas. En el bulbo raquídeo, el axón de Mauthner establece contactos sinápticos con fibras gigantes que tienen su origen en interneuronas craneales (Hackett y Buchheim, 1984; Barry y Bennet, 1990). Las fibras ascendentes establecen sinapsis excitatorias químicas y eléctricas con núcleos motores de nervios craneales, incluyendo a los nervios III, IV, V, y VII (Hackett y Faber, 1983; Hackett y Buchheim, 1984; Barry y Bennett, 1990).

INMUNORREACTIVIDAD A LA CARNOSINA Y/O DIPÉPTIDOS RELACIONADOS EN CÉLULAS GLIALES DEL ENCÉFALO DEL MÚGIL

En el múgil, de manera similar a otros vertebrados (Biffo y col., 1990; Artero y col., 1991a, b; De Marchis y col., 1997; Peretto y col., 1998; Bonfanti y col., 1999) la carnosina y/o péptidos relacionados también se distribuye en algunas poblaciones de células gliales de diferentes zonas encefálicas.

Se han observado células Car-ir en el epéndimo de varias zonas telencefálicas y diencefálicas, tanto en el múgil como en elasmobranquios. En roedores también se ha observado carnosina en células endimarias (Biffo y col., 1990; De Marchis y col., 1997; Peretto y col., 1998; Bonfanti y col., 1999), así como en células de la capa subependimaria a lo largo de todo el encéfalo. Por el contrario, las células gliales Car-ir observadas en la capa subependimaria del múgil se restringen a regiones exclusivamente diencefálicas. Estos resultados resultan de gran interés, ya que el epéndimo y los precursores de la capa subependimaria son considerados como el compartimento de células madre potenciales con capacidad de regeneración celular

tanto en el cerebro adulto de mamíferos (Morshead y col., 1994; Johansson y col., 1999; Doetsch y col., 1999), como en el de peces (múgil: Arochena y col., 2004; pez cebra: Diotel y col., 2015).

En el nervio óptico del múgil se ha observado la presencia de la carnosina y/o péptidos relacionados en supuestas células de la microglia y astrocitos reticulares, que en el caso de roedores, se encuentran localizados a lo largo del encéfalo tanto en la materia gris como en la materia blanca. Estudios recientes en el carpín dorado demostraron, tras lesiones inducidas en el nervio óptico, que los astrocitos aquí ubicados están directamente relacionados con el proceso de regeneración axonal (Parrilla y col., 2013). Otra población de células gliales Car-ir observada en el múgil se encuentra situada en una región glial que separa el estrato periventricular del techo óptico y la superficie ventricular (Arochena y col., 2004). Dado que en el múgil las zonas de regeneración celular dentro del techo óptico están localizadas en áreas próximas al toro longitudinal, no parece probable que las células gliales Car-ir observadas estén relacionadas con la función de regeneración celular.

Como se puede observar, las células gliales Car-ir del múgil y elasmobranquios estudiados se encuentran situadas en áreas que están directamente relacionadas, en la mayoría de los casos, con áreas consideradas como compartimentos de células madre potenciales capaces de participar en la regeneración celular en el encéfalo adulto, aunque el papel de la carnosina, de existir, en dicho proceso no ha sido estudiado.

IMPLICACIONES FUNCIONALES DE LA CARNOSINA Y/O DIPÉPTIDOS RELACIONADOS

Diversos estudios han demostrado que la carnosina y/o péptidos relacionados pueden actuar con diferentes funciones: como agentes protectores, antioxidantes, quelantes metálicos, eliminadores de radicales libres e inhibidores de la glicosilación proteica (De Marchis y col., 2000). Además, la carnosina parece tener un efecto beneficioso en el crecimiento, morfología y longevidad de fibroblastos humanos en cultivo (McFarland y Holliday, 1999) y se ha demostrado *in vitro* que la carnosina protege a las células grana del cerebelo de rata del daño provocado por los radicales libres (Boldyrev y col., 1999). En cultivos de células endoteliales del cerebro de rata, la carnosina tiene una acción protectora ante los efectos del péptido neurotóxico β -

amiloide, que está implicado en alteraciones vasculares cerebrales y en la enfermedad de Alzheimer (Preston y col., 1998).

En las últimas décadas, gran parte de los estudios científicos se han volcado en la investigación de enfermedades que afectan a buena parte de la población humana, como pueden ser el cáncer, enfermedades neurodegenerativas y/o aquéllas que afectan a algún determinado tejido u órgano. Asimismo, cabe mencionar otra de las preocupaciones del ser humano en el que la carnosina tiene un papel importante: el envejecimiento. Por ello, la carnosina, dado el alto número de funciones que se le atribuyen a nivel celular, ha sido objeto de numerosos estudios para su posible aplicación terapéutica en enfermedades neurodegenerativas, cáncer y otras patologías.

Se han realizado estudios sobre el efecto que produce la carnosina en la proteína de mayor concentración en las lentes de mamíferos (α -cristalina), cuya alteración de concentración y composición química produce las cataratas. Se comprobó que la carnosina interactúa con dicha proteína mediante interacciones hidrofóbicas que mantienen la integridad estructural de la α -cristalina, abriendo nuevas estrategias de intervención para el tratamiento de esta patología (Villari y col., 2014). Recientemente se ha desarrollado un complejo lipofílico con la carnosina que ofrece un nuevo tratamiento para las cataratas seniles en humanos (Abdelkader y col., 2015).

Diversos estudios realizados en tejidos sometidos a diferentes tipos de estrés con doxorubicina (DOX), revelaron que la carnosina tenía un efecto protector en los casos de toxicidad por DOX en tejidos cardíacos, hepáticos y renales (Kumral y col., 2015). En células epiteliales cardíacas, la carnosina produce la liberación de calcio, contracción y alteración de proteínas contráctiles, por lo que podría considerarse como un modulador de las proteínas que regulan el calcio en células musculares (Roberts y Zaloga, 1999). Recientemente se realizó un modelo de lesión pulmonar aguda mediante una infección a ratones con el virus de la gripe porcina, demostrando que el estrés oxidativo producido por el virus generaba lesiones patológicas e incluso la muerte. Los niveles de supervivencia se incrementaban considerablemente tras la administración de carnosina, además de disminuir las lesiones patológicas generadas en los pulmones (Xu y col., 2015). En estudios de lesiones provocadas cerca del

cerebro de rata se observó que la carnosina también tiene un efecto neuroprotector respecto a la inflamación, apoptosis y daño oxidativo (Baky y col., 2015). Estos efectos neuroprotectores también han sido demostrados en estudios de isquemia cerebral, donde se observó que la carnosina y/o péptidos relacionados (histidina) reducen los infartos cerebrales y aminoran los daños neurológicos (Min y col., 2008; Bae y Majid, 2013).

Muchas condiciones neurodegenerativas y del envejecimiento están asociadas a una disfunción del complejo proteico (proteosoma) que se encarga de la degradación de proteínas dañanas o innecesarias para la célula. Se ha comprobado que los lóbulos olfatorios presentan altas cantidades de carnosina y zinc, pudiendo la carnosina suprimir la toxicidad que producen altas concentraciones de zinc y cobre en las neuronas olfatorias. Asimismo, la disfunción olfatoria está asociada a condiciones neurodegenerativas, ya que se han encontrado altos niveles de zinc en pacientes que presentaban la enfermedad de Alzheimer. Así, se sugiere que un posible inhibidor de esta disfunción proteosómica mediada por zinc/cobre sería la administración vía nasal de carnosina (Hipkiss, 2005). Estudios realizados en neuronas hipotalámicas ante una neurotoxicidad inducida por zinc demostraron una actividad neuroprotectora de la carnosina mediante la regulación del estrés vía retículo endoplasmático, lo cual hace de la carnosina y/o péptidos relacionados una posible vía terapéutica para el tratamiento de demencias vasculares así como otras enfermedades neurodegenerativas (Mizuno y col., 2000). Estudios experimentales y de simulación de la dinámica de la molécula carnosina frente al péptido neurotóxico β -amiloide demostraron que, aunque la carnosina no forma uniones estables con el péptido neurotóxico, sí podría bloquear la vía por la cual se forman los agregados, desestabilizando la red de puentes de hidrógeno que se forman en los agregados del péptido β -amiloide (Attanasio y col., 2013). En ensayos clínicos con pacientes aquejados de la enfermedad de Parkinson, se comprobó que la suplementación alimenticia con carnosina produce una mejoría de los síntomas neurológicos, y aumenta la eficiencia de los tratamientos terapéuticos que se llevan a cabo en los pacientes mediante la administración de dopamina (Boldyrev y col., 2008). También se ha comprobado en neuronas del hipocampo de rata que, junto con el zinc y el cobre, la carnosina atenúa la neurotoxicidad del prión PrP106-126, formulándose como uno de los posibles candidatos para la creación de tratamientos terapéuticos

contra enfermedades priónicas (Kawahara y col., 2015).

Otra de las enfermedades que afecta a un alto porcentaje de individuos de la especie humana es el cáncer, y consecuentemente investigaciones al respecto son cada vez más numerosos. Los efectos oxidativos celulares pueden dañar mediante roturas, divergencias y acortamientos a los cromosomas, limitando la esperanza de vida celular, acelerando el envejecimiento celular e incluso la transformación de estas células en células cancerígenas. En ensayos con fibroblastos en continuo crecimiento con aporte de carnosina, se observaron unas tasas de daño y acortamiento telomérico más bajas que en cultivos control, contribuyendo este dipéptido a la protección cromosómica celular y consecuentemente al aumento de la esperanza de vida (Shao y col., 2004). En estudios recientes realizados con células tumorales, el aporte de carnosina produjo una inhibición de su crecimiento por diferentes mecanismos, señalando a la carnosina como un dipéptido pluripotente y un ejemplo de una “droga inteligente” endógena (Hipkiss y Gaunitz, 2014). También en células gástricas cancerígenas humanas, la carnosina parece jugar un papel importante como regulador del metabolismo energético (Shen y col., 2014).

Otra de las líneas de investigación que está siendo desarrollada entre empresas dedicadas a la suplementación nutricional, así como empresas cosméticas, es la incorporación de la carnosina y/o péptidos relacionados en determinados productos nutricionales y cosméticos. Estudios realizados en humanos de avanzada edad para evaluar la capacidad física y mental que producía la suplementación de carnosina y/o péptidos relacionados en la dieta, revelaron el aumento de la capacidad cognitiva del grupo con una dieta con carnosina frente al grupo placebo. Asimismo, en cuanto a la capacidad física también se observaron resultados más satisfactorios para el grupo al que se le había suministrado este dipéptido (Szczesniak y col., 2014). Un reciente estudio de la asociación internacional de nutrición deportiva recopiló datos sobre los mecanismos de acción y el uso de una suplementación nutricional de beta-alanina. Las conclusiones plantean la beta-alanina aumenta la concentración de carnosina en el músculo, actuando como tamponador intracelular. A dosis recomendadas no es dañina para la población, atenúa la fatiga muscular particularmente en personas mayores, e incrementa el desempeño táctico en sujetos militares (Trexler y col., 2015). Además, cabe mencionar que la carnosina está presente en muchos productos

con efectos “rejuvenecedores” de marcas de prestigio dentro de la industria cosmética.

De las funciones más importantes que se pueden destacar de este dipéptido dentro del sistema nervioso, es la que está relacionada con la neurotransmisión, bien como neurotransmisor o neuromodulador (Margolis, 1974, 1978, 1980). Esta hipótesis fue planteada debido a los elevados niveles de carnosina en el sistema olfatorio de varias especies de mamíferos (Margolis, 1974; Neidle y Kander, 1974; Wideman y col., 1978, Burd y col., 1982), incluyendo la especie humana (Kish y col., 1979) y su localización específica en las neuronas olfatorias (Sakai y col., 1987, 1990; Biffo y col., 1990).

En cuanto a los péptidos relacionados, además de la anserina e histidina, la homocarnosina parece ser el sustrato fisiológico de la carnosinasa, una dipeptidasa que es sintetizada en el cerebro humano, donde hidroliza homocarnosina para liberar GABA (ácido γ -aminobutírico) (Grove y col., 1982). Si falta este enzima, la homocarnosina se acumula en grandes cantidades en el cerebro y en el líquido cefalorraquídeo produciendo una alteración denominada homocarnosinosis (Lenney y col., 1983). Se ha observado, además, una coincidencia de la actividad de la carnosinasa y la expresión de homocarnosina en algunos sistemas de fibras y neuronas en determinadas zonas del cerebro humano, tales como el córtex, el cerebelo y el bulbo olfatorio, lo cual puede indicar que esos son los lugares para la liberación de GABA. Aunque no se conocen los mecanismos involucrados en la hidrólisis de homocarnosina, en las neuronas en las que se colocaliza la carnosinasa y homocarnosina el enzima y su sustrato están posiblemente almacenados en diferentes compartimentos subcelulares y, la incorporación o la liberación desde esos compartimentos debe ser un requisito previo para que se produzca la hidrólisis. En este sentido, puede ocurrir que el GABA se forme dentro de la neurona y posteriormente sea liberado o que el GABA se forme en el fluido intersticial o en la hendidura sináptica como resultado de la secreción de la carnosinasa y la homocarnosina (Grove y col., 1982; Lenney y col., 1983; Jackson y col., 1994). En las zonas en las que se han detectado el enzima y la homocarnosina en neuronas diferentes pero adyacentes o en prolongaciones neuronales, puede ocurrir un proceso similar de secreción de ambos componentes. Si las neuronas adyacentes están en

contacto sináptico, es posible que carnosinasa y sustrato sean secretados en la hendidura sináptica donde se produce la hidrólisis y la liberación de GABA. En cualquier caso, la hidrólisis de homocarnosina parece representar una nueva y significativa fuente fisiológica de GABA en el cerebro humano, además del GABA formado por la descarboxilación del ácido glutámico por el enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) (Jackson y col., 1994).

En diversas especies de teleósteos se ha estudiado la distribución de neuronas y circuitos GABAérgicos dándose la circunstancia de que, al menos en algunos casos, como en trucha (Anglade y col., 1999), en carpín dorado (Martyniuk y col., 2007), así como en pez cebra (Mueller y Guo, 2009), esas poblaciones neuronales GABA-ir coinciden con las que expresan carnosina en el mágil. Concretamente, el patrón de distribución de la carnosina en el cerebelo del mágil coincide con el encontrado para el GABA y descarboxilasa del ácido glutámico en pez cebra (Delgado y Schmachtenberg, 2008).

Los resultados obtenidos en el mágil revelan, sin género de duda, amplias diferencias en la distribución celular de la carnosina con respecto al cerebro de los vertebrados estudiados, lo cual podría indicar que las funciones fisiológicas de la carnosina y/o péptidos relacionados podrían ser diferentes, y también dentro de los grupos de peces, dadas las diferencias observadas en el mágil y elasmobranquios con respecto al pez cebra. Aunque en el cerebro del mágil se observó que la inmunorreactividad a la carnosina está presente también en fibras, neuropilos y células gliales, la mayor concentración de este dipéptido se encuentra en somas neuronales, algo que contrasta con la distribución de la mayor parte de los neurotransmisores.

CONSIDERACIONES FINALES

Al igual que lo observado para la carnosina, hay muchas otras sustancias que presentan diferencias en cuanto a su localización celular entre teleósteos y mamíferos. En teleósteos, la expresión de la aromatasa en el cerebro está presente en células gliales (Forlano y col., 2001; Menuet y col., 2003) aumentándose su expresión en células gliales tras un daño (Saldaña y col., 2000; Veney y Rissman, 2000). Por el contrario, en mamíferos, esta enzima se encuentra en neuronas (García-Ovejero y col., 2005). Otras discrepancias similares también se aprecian en la

expresión de la actividad de la NADPH-diaforasa en el cerebro, la cual en algunos teleósteos muestra una distribución tanto glial como neuronal (Arévalo y col., 1995; Pérez y col., 1996; Manso y col., 1997; Ota y col., 1999), aunque en el caso de tetrápodos su distribución es solamente neuronal (Scherer-Singler y col., 1983; Leigh y col., 1990; Hope y col., 1991; López y González, 2002). Esto sugiere que, como en otros sistemas, el sistema de expresión de la carnosina y/o péptidos relacionados ha sufrido importantes cambios durante la filogenia.

Por otro lado, resulta interesante, una vez analizados los resultados encontrados sobre la distribución de la carnosina y/o péptidos relacionados en el mágil (Lamas y col., 2007a, ver anexo I), pez cebra (Senut y col., 2009), elasmobranquios (resultados no publicados) y *Polypterus* (Lamas y col., 2007b), destacar el hecho de que en las especies que presentan una distribución de la carnosina más amplia se corresponden con especies capturadas en las costas gallegas y, por tanto, de agua salada (mágil, raya, pintarroja), a diferencia de las otras especies estudiadas, *Polypterus senegalus* y pez cebra, que se criaron y mantuvieron en cautividad. Como se ha mencionado anteriormente, la carnosina tiene un papel importante actuando como neuroprotector en presencia de determinados compuestos tóxicos. Muchos iones metálicos pueden inducir un estrés oxidativo, causante de varias patologías, lo cual podría inducir la actividad o el aumento de expresión de la carnosina ante tales condiciones ambientales. Las diferencias observadas en la distribución de la carnosina en especies de organismos marinos (mágil, raya, pintarroja), con respecto a los mantenidos en medios controlados y de agua dulce (*Polypterus*, pez cebra), podrían estar relacionadas con la función de quelante metálico atribuida a la carnosina (De Marchis, 2000), dadas las distintas condiciones ambientales existentes entre ambos medios.



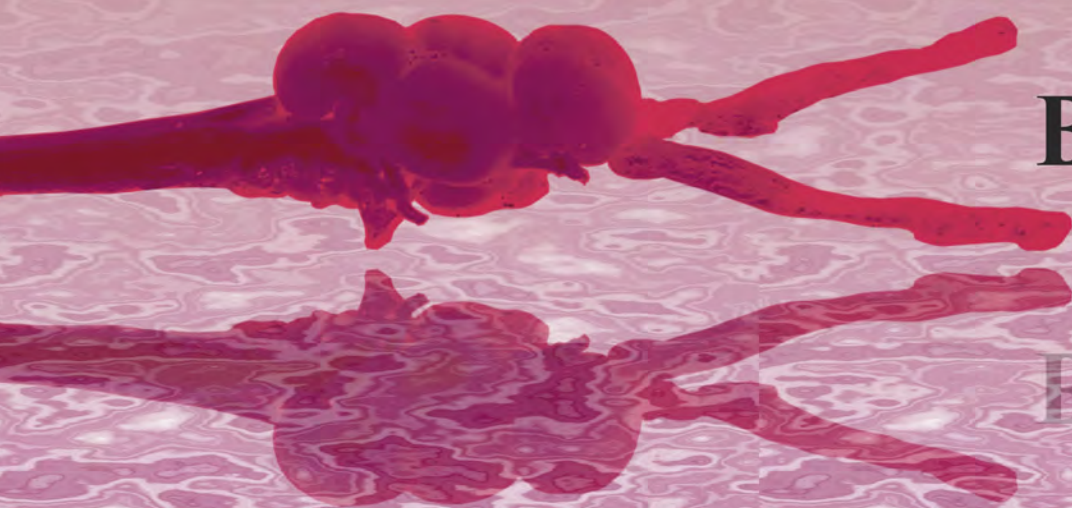
Conclusiones

Conclusions



Del análisis e interpretación (discusión) de los resultados obtenidos en el presente trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- 1) Por primera vez se ha demostrado, mediante métodos inmunohistoquímicos, la presencia de carnosina en el encéfalo adulto de un teleósteo en numerosas poblaciones neuronales pertenecientes a las principales subdivisiones del encéfalo.
- 2) La mayoría de las células, que en el múgil son inmunorreactivas a la carnosina, forman parte de poblaciones neuronales que, según demuestran los estudios hodológicos realizados en otros teleósteos, están implicadas en circuitos específicos, tanto de carácter sensorial como motor.
- 3) Los resultados obtenidos en el múgil refuerzan la hipótesis sobre una posible función de la carnosina en el proceso de la neurotransmisión, bien como neurotransmisor o como neuromodulador.
- 4) La localización observada para la carnosina en ciertos núcleos y regiones del encéfalo del múgil revela la utilidad de este dipéptido como marcador para estudios neuroanatómicos y/o citoarquitectónicos en esta especie de teleósteo.
- 5) La inmunorreactividad para la carnosina no sólo está presente en poblaciones neuronales, ya que también se localiza en ciertas poblaciones gliales de diferentes subdivisiones del encéfalo del múgil, algunas de las cuales constituyen el compartimento de regeneración celular en el encéfalo adulto de mamíferos.
- 6) A diferencia de lo observado en reptiles, aves y mamíferos, en el múgil la carnosina se localiza principalmente en poblaciones neuronales encefálicas y no ha sido detectada ni en el sistema olfatorio ni en la retina.



Bibliografía

Βιβλιογραφία



- Abdelkader H, Swinden J, Pierscioneck BK, Alany RG. 2015. Analytical and physicochemical characterisation of the senile cataract drug dipeptide β -alanyl-L-histidine (carnosine). *J Pharm Biomed Anal* 114:241-246.
- Ackermann D, Timpe O, Poller K. 1929. *Z Physiol Chem*, 183:181.
- Alonso JR, Cara J, Miguel JJ, Aijón J. 1987. Ruffed cells in the olfactory bulb of freshwater teleosts. I. Golgi impregnation. *J Anat* 155:101-107.
- Alonso JR, Arévalo R, Briñón JG, Lara J, Weruaga E, Aijon J. 1992. Parvalbumin immunoreactive neurons and fibres in the teleost cerebellum. *Anat Embryol* 185:355-361.
- Altman J. 1969. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 137:433-457.
- Allum JHJ, Greef NG, Tokonaga A. 1981. Projections to the rostral and caudal abducens nuclei in the goldfish. En: Fuchs AF Becker W (Eds). *Progress in oculomotor research*. Elsevier, Amsterdam, pp:253-262.
- Anglade I, Mazurais D, Douard V, Le Jossic-Corcos C, Mañanos EL, Michel D, Kah O. 1999. Distribution of glutamic acid decarboxylase mRNA in the forebrain of the rainbow trout as studied by in situ hybridization. *J Comp Neurol* 410:277-289.
- Arévalo R, Alonso JR, García-Ojeda E, Briñón JG, Crespo C, Aijón J. 1995. NADPH-diaphorase in the central nervous system of the tench (*Tinca tinca* L., 1758). *J Comp Neurol* 352:398-420.
- Arochena M, Anadón R, Díaz-Regueira S. 2004. Development of vimentin and glial fibrillary acidic protein immunoreactivities in the brain of gray mullet (*Chelon labrosus*), an advanced teleost. *J Comp Neurol* 469:413-436.
- Artero C, Marti E, Biffo S, Mulatero B, Andreone C, Margolis FL, Fasolo A. 1991a. Carnosine in the brain and olfactory system of amphibia and reptilia: a

- comparative study immunocytochemical and biochemical methods. *Neurosci Lett* 2:182-186.
- Artero C, Mulatero B, Biffo S, Gozzo S, Margolis FL, Fasolo A. 1991b. Distribution of carnosine-like immunoreactivity in the brain of the crested newt. *Brain Behav Evol* 37:168-178.
- Attanasio F, Convertino M, Magno A, Caflisch A, Corazza A, Haridas H, Esposito G, Cataldo S, Pignataro B, Milardi D, Rizzarelli E. 2013. Carnosine inhibits A β (42) aggregation by perturbing the H-bond network in and around the central hydrophobic cluster. *Chembiochem* 14:583-592.
- Bae ON, Majid A. 2013. Role of histidine/histamine in carnosine-induced neuroprotection during ischemic brain damage. *Brain Res* 1527:246-254.
- Baky NA, Fadda L, Al-Rasheed NM, Al-Rasheed NM, Mohamed A, Yacoub H. 2015. Neuroprotective effect of carnosine and cyclosporine-A against inflammation, apoptosis, and oxidative brain damage after closed head injury in immature rats. *Toxicol Mech Methods* 19:1-10.
- Ballintijn CM, Alink GM. 1977. Identification of respiratory motor neurons in the carp and determination of their firing characteristics and interconnections. *Brain Res* 136:261-276.
- Ballintijn CM, Roberts BL, Luiten PGM. 1983. Respiratory responses to stimulation of branchial vagus nerve ganglia of a teleost fish. *Respir Physiol* 51:241-257.
- Bamford OS. 1974. Respiratory neurones in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp Biochem Physiol* 48:77-83.
- Barry MA, Bennett MVL. 1990. Projections of giant fibers, a class of reticular interneurons, in the brain of the silver hatchetfish. *Brain Behav Evol* 36:391-400.
- Bass AH. 1981. Telencephalic efferents in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*: projections to the olfactory bulb and optic tectum. *Brain Behav Evol* 19:1-

16.

- Batten TFC, Cambre ML, Moons L, Vandesande F. 1990a. Comparative distribution of neuropeptide-immunoreactive systems in the brain of the green molly, *Poecilia latipinna*. J Comp Neurol 302:893-919.
- Batten TFC, Moons L, Cambre ML, Vandesande F, Seki T, Suzuki M. 1990b. Thyrotropin-releasing hormone-immunoreactive systems in the brain and pituitary gland of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Teleostei). Gen Comp Endocrinol 79:385-392.
- Batten TFC, Berry PA, Maqbool A, Moons L, Vandesande F. 1993. Immunolocalization of catecholamine enzymes, serotonin, dopamine and L-Dopa in the brain of *Dicentrarchus labrax* (Teleostei). Brain Res Bull 31:233-252.
- Bauer K. 2005. Carnosine and homocarnosine, the forgotten, enigmatic peptides of the brain. Neurochem. Res 30:1339-1345.
- Bauer K, Salnikow J, de Vitry F, Tixier-Vidal A, Kleinkauf H. 1979. Characterization and biosynthesis of omega-aminoacyl amino acids from rat brain and the C-6 glioma cell line. J Biol Chem 254:6402-6407.
- Bauer K, Hallermayer K, Salnikow J, Kleinkauf H, Hamprecht B. 1982. Biosynthesis of carnosine and related peptides by glial cells in primary culture. J Biol Chem 257:3593-3597.
- Becerra M, Manso MJ, Rodríguez-Moldes I, Anadón R. 1994. Primary olfactory fibres Project to the ventral telencephalon and preoptic region in trout (*Salmo trutta*): a developmental immunocytochemical study. J Comp Neurol 342:131-143.
- Behrend K, Donicht M. 1990. Descending connections from the brainstem to the spinal cord in the electric fish *Eigenmannia*. Quantitative description based on retrograde horseradish peroxidase and fluorescent-dye transport. Brain Behav Evol 35:227-239.

- Bell CC. 1981a. Central distribution of octavolateral afferents and efferents in a teleost (Mormyridae). *J Comp Neurol* 195:391-414.
- Bell CC. 1981b. Some central connections of medullary octavolateral centers in a mormyrid fish. En: Tavalga WN, Popper AN, Fay RR. (Eds) *Hearing and sound communication in fishes*. Springer, Berlin Heidelberg, New York, pp:383-392.
- Bell CC, Szabo T. 1986. Central structures and pathways of the mormyrid electrosensory system. En: Bullock TH, Heiligenberg W (Eds) *Electroreception*. Wiley, New York, pp:375-421.
- Bergqvist H. 1932. Zur morphologie des Zwischenhirns bei niedrigen wisbeltieren. *Acta Zool* 13:57-304.
- Bergqvist H, Källén B. 1954. Notes on the early histogenesis and morphogenesis of the central nervous system in vertebrates. *J Comp Neurol* 100:627-660.
- Bernardos RL, Raymond PA. 2006. GFAP transgenic zebrafish. *Gene Expr Patterns* 6:1007-1013.
- Biffo S, Grillo M, Margolis FL. 1990. Cellular localization of carnosine-like and anserine-like immunoreactivities in rodent and avian central nervous system. *Neurosci* 35: 637-651.
- Boldyrev AA, Jonhson P, Wei Y, Tan Y, Carpenter DO. 1999. Carnosine and taurine protect rat cerebellar granular cells from free radical damage. *Neurosci Lett* 163:169-172.
- Boldyrev A, Fedorova T, Stepanova M, Dobrotvorskaya I, Kozlova E, Boldanova N, Bagyeva G, Ivanova-Smolenskaya I, Illarioshkin S. 2008. Carnosine [corrected] increases efficiency of DOPA therapy of Parkinson's disease: a pilot study. *Rejuvenation Res* 11:821-827.
- Bonfanti L, Peretto P, De Marchis S, Fasolo A. 1999. Carnosine-related dipeptides in the mammalian brain. *Prog Neurobiol* 59:333-353.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram

- quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Bradford MR, Northcutt RG. 1983. Organization of the diencephalon and pretectum of the ray-finned fishes. En: Davis RE, Northcutt RG *Fish Neurobiology. II. Higher brain areas and functions*. University of Michigan Press, Ann Arbor, pp:117-163.
- Brantley RK, Bass AH. 1988. Cholinergic neurons in the brain of a teleost fish (*Porichthys notatus*) located with a monoclonal antibody to choline acetyl transferase. *J Comp Neurol* 275:87-105.
- Broglio C, Gómez A, Durán E, Ocaña FM, Jiménez-Moya F, Rodríguez F, Salas C. 2005. Hallmarks of a common forebrain vertebrate plan: specialized pallial areas for spatial, temporal and emotional memory in actinopterygian fish. *Brain Res Bull* 66:277-281.
- Burd GD, Davis BJ, Macrides F, Grillo M, Margolis FL. 1982. Carnosine in primary afferents of the olfactory system: an autoradiographic and biochemical study. *J Neurosci* 2:244-255.
- Butler AB, Wullimann MF, Northcutt RG. 1991. Comparative cytoarchitectonic analysis of some visual pretectal nuclei in teleost. *Brain Behav Evol* 38:92-114.
- Cabrera B, Torres B, Pásaro R, Pastor AM, Delgado-García JM. 1991. A morphological study of abducens nucleus motoneurons and internuclear neurons in the goldfish (*Carassius auratus*). *Brain Res Bull* 28:137-144.
- Carr CE, Maler L. 1986. Electoreception in gymnotiform fish. Central anatomy and physiology. En: Bullock TH, Heiligenberg W (Eds) *Electoreception*. Wiley, New York, pp:319-374.
- Castro A, Becerra M, Manso MJ, Anadón R. 2003. Distribution and development of calretinin-like immunoreactivity in the telencephalon of the brown trout, *Salmo trutta fario*. *J Comp Neurol* 467:254-269.

- Castro A, Becerra M, Manso MJ, Anadón R. 2006. Calretinin immunoreactivity in the brain of the zebrafish, *Danio rerio*: distribution and comparison with some neuropeptides and neurotransmitter-synthesizing enzymes. I. Olfactory organ and forebrain. *J Comp Neurol* 494:435-459.
- Castro A, Becerra M, Anadón R, Manso MJ. 2008. Distribution of calretinin during development of the olfactory system in the brown trout, *Salmo trutta fario*: Comparison with other immunohistochemical markers. *J Chem Neuroanat* 35:306-316.
- Clemente D, Porteros A, Weruaga E, Alonso JR, Arenzana FJ, Aijón J, Arévalo R. 2004. Cholinergic elements in the zebrafish central nervous system: histochemical and immunohistochemical analysis. *J Comp Neurol* 474:75-107.
- Cohen SL, Kriebel RM. 1989. Brainstem localization of serotonin neurons projecting to the caudal neurosecretory complex. *Brain Res Bull* 22:481-487.
- Corujo A, Anadón R. 1986. Morfogénesis del diencéfalo de la trucha arco-iris (*Salmo gairdneri* Richardson). I. Epitálamo. *Acta Microsc* 9:55-56.
- Corujo A, Anadón R. 1990. The development of the diencephalon on the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). Thalamus and hypothalamus. *J Hirnforsch* 31:669-680.
- Crowe MJ, Pixley SK. 1991. Monoclonal antibody to carnosine synthetase identifies a subpopulation of frog olfactory receptor neurons. *Brain Res* 538:147-151.
- Cuadrado MI. 1987. The cytoarchitecture of the torus semicircularis in the teleost *Barbus meridionalis*. *J Hirnforsch* 30:371-374.
- Cuadrado MI. 1989. A quantitative study of the torus semicircularis of *Barbus meridionalis*. *J Morphol* 191:233-245.
- Chanconie M, Clairambault P. 1975. Development of the telencephalon of *Salmo iridens* Gib. *J Hirnforsch* 16:75-89.
- Davis RE, Northcutt RG. 1983. Fish Neurobiology. Volume I. Ann Arbor, The

University of Michigan Press.

De Marchis S, Melcangi RC, Modena C, Cavaretta I, Peretto P, Agresti C, Fasolo A. 1997. Identification of the glial cell types containing carnosine-related peptides in the rat brain. *Neurosci Lett* 237:37-40.

De Marchis S, Modena C, Peretto P, Migheli A, Margolis FL, Fasolo A. 2000. Carnosine-related dipeptides in neurons and glia. *Biochemistry (Moscow)* 65:969-980.

Delgado L, Schmachtenberg O. 2008. Immunohistochemical localization of GABA, GAD65, and the receptor subunits GABAA α 1 and GABAB1 in the zebrafish cerebellum. *Cerebellum* 3:444-450.

Demski LS. 2013. The pallium and mind/behavior relationships in teleost fishes. *Brain Behav Evol* 82:31-44.

Demski LS, Knigge KM. 1971. The telencephalon and hypothalamus of the bluegill *Lepomis macrochirus*: evoked feeding aggressive and reproductive behavior with representative frontal sections. *J. Comp. Neurol* 143:1-16.

Demski LS, Northcutt RG. 1983. The terminal nerve: a new chemosensory system in vertebrates. *Science* 220:435-437.

Demski LS, Sloan HE. 1985. A direct magnocellular-preoptico-spinal pathway in goldfish: implications for control of sex behavior. *Neurosci Lett* 55:283-288.

Díaz-Regueira S. (1987). Núcleos y Conexiones primarias de los Nervios Bulbares del Teleosteo *Chelon labrosus*, con especial atención al sistema octavolateral. (Tesis Doctoral).

Díaz-Regueira S, Anadón R. 1989. Central projections of the lateral line nerves of *Chelon labrosus* (Teleosts, O. Perciformes). *J Hirnforsch* 30:339-347.

Díaz-Regueira S, Anadón R. (1990). Primary nerve projections and primary nuclei of the octaval nerve in the teleost *Chelon labrosus*. An HRP study. *J*

Hirnforsch 31:705-714.

Díaz-Regueira S, Anadón R. 1992. Central projections of the vagus nerve in *Chelon labrosus* Risso (Teleostei, O. Perciformes). Brain Behav Evol 40:297-310.

Díaz-Regueira S, Anadón R. 1995. Fine structure of the medullary lateral line area of *Chelon labrosus* (order perciformes), a nonelectroreceptive teleost. J Comp Neurol 351(3):429-440.

Díaz-Regueira S, Anadón R. 2000. Calretinin expression in specific neuronal systems in the brain of an advanced teleost, the grey mullet (*Chelon labrosus*). J Comp Neurol 426:81-105.

Díaz-Regueira S, Becerra M, Anadón R. 1992. Light- and electron microscopic study of oligodendrocytes in the lateral line area of the medulla in *Chelon labrosus*. J Hirnforsch 33:477-485.

Díaz-Regueira SM, Lamas I, Anadón R. 2005. Calretinin immunoreactivity in taste buds and afferent fibers of the grey mullet *Chelon labrosus*. Brain Res 1031:297-301.

Diotel N, Beil T, Strähle U, Rastegar S. 2015. Differential expression of id genes and their potential regulator znf238 in zebrafish adult neural progenitor cells and neurons suggests distinct functions in adult neurogenesis. Gen Espr Patterns 133:30001-30006.

Doetsch F, Caillé I, Lim DA, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 1999. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. Cell 97:703-716.

Drescher MJ, Drescher DG. 1991. N-acetylhistidine, glutamate and beta-alanine are concentrated in a receptor cell layer of the trout inner ear. J Neurochem 56:658-664.

Ebbesson SOE, Vanegas H. 1976. Projections of the optic tectum in two teleost species. J Comp Neurol 165: 161-180.

Ebbesson SO, Ito H. 1980. Bilateral retinal projections in the black piranha

- (*Serrasalmus niger*). Cell Tissue Res 213, 483-495.
- Ebbesson SO, Meyer DL. 1981. Efferents to the retina have multiple sources in teleost fish. Science 214:924-926.
- Echteler SM, Saidel WM. 1981. Forebrain connections in the goldfish support telencephalic homologies with land vertebrates. Science 212:683-685.
- Echteler SM. 1985. Tonotopic organization in the midbrain of a teleost fish. Brain Res 338:387-391.
- Ekström P. 1987a. Distribution of choline acetyltransferase immunoreactive neurons in the brain of a cyprinid teleost (*Phoxinus phoxinus*, L.) J Comp Neurol 256:494-516.
- Ekström P. 1987b. Photoreceptors and CSF contacting neurons in the pineal organ of a teleost fish have direct axonal connections with the brain: an HRP study. J Neurosci 7:987-995.
- Ekström P, Van-Veen T. 1984. Distribution of 5-hydroxytryptamine (serotonin) in the brain of the teleost *Gasterosteus aculeatus* L. J Comp Neurol 226:307-320.
- Ekström P, Ebbesson SOE. 1989. Distribution of serotonin-immunoreactive neurons in the brain of sockeye salmon fry. J Chem Neuroanat 2:201-213.
- Ekström P, Rescheke M, Steinbusch M, van Veen T. 1986. Distribution of noradrenaline in the brain of a teleost *Gasterosteus aculeatus* L.: an immunohistochemical analysis. J Comp Neurol 254:297-313.
- Ekström P, Honkanen T, Ebbesson SOE. 1988. FMRF-amide-like immunoreactive neurons of the nervus terminalis of teleosts innervate both retina and pineal organ. Brain Res 460:68-75.
- Ekström P, Honkanen T, Steinbusch HWM. 1990. Distribution of dopamine-immunoreactive neuronal perikarya and fibers in the brain of a teleost, *G. aculeatus*. Comparison with TH- and DBH-ir neurons. J Chem Neuroanat 3:233-260.

- Fay RR, Hillery CM, Bolan K. 1982. Representation of sound pressure and particle motion information in the midbrain of the goldfish. *Comp Biochem Physiol* 71:181-191.
- Fetcho JR, Svoboka KR. 1993. Fictive swimming elicited by electrical stimulation of the midbrain in goldfish. *J Neuro Physiol* 70:765-780.
- Finger TE. 1978a. Cerebellar afferents in teleost catfish (Ictaluridae). *J Comp Neurol* 181:173-182.
- Finger TE. 1978b. Efferent neurons of the teleost cerebellum. *Brain Res* 153:608-614.
- Finger TE. 1983a. Organization of the teleost cerebellum. En: Northcutt RG, Davis RE. (Eds) *Fish Neurobiology. I. Brain stem and sense organs*. University of Michigan Press, Ann Arbor, pp:261-284.
- Finger TE. 1983b. The gustatory system in teleost fish. En: Northcutt RG, Davis RE (Eds). *Fish Neurobiology. I. Brainstem and sense organs*. University of Michigan Press, Ann Arbor, pp:285-309.
- Finger TE. 1988. Sensory motor mapping and oropharyngeal reflexes in goldfish, *Carassius auratus*. *Brain Behav Evol* 31:17-24.
- Finger TE, Tong SL. 1984. Central organization of eighth nerve and mechanosensory lateral line systems in the brainstem of ictalurid catfish. *J Comp Neurol* 229:129-151.
- Fisher DE, Amend JF, Strumeyer DH. 1977. Anserine and carnosine in chicks (*Gallus gallus*) rat pups (*Rattus rattus*) and ducklings (*Anas platyrhynchos*): comparative ontogenetic observations. *Comp Biochem Physiol* 56:367-70.
- Flament-Durand J, Brion JP. 1985. Tanycytes: morphology and functions: a review. *Int Rev Cytol* 96:121-155.
- Folgueira M, Anadón R, Yáñez J. 2004a. An experimental study of the connections of the telencephalon in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). I: Olfactory bulb and ventral area. *J Comp Neurol* 480:180-203.

- Folgueira M, Anadón R, Yáñez J. 2004b. Experimental study of the connections of the telencephalon in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). II: Dorsal area and preoptic region. *J Comp Neurol* 480:204-233.
- Folgueira M, Anadón R, Yáñez J. 2005. Experimental study of the connections of the preglomerular nuclei and corpus mamillare in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Brain Res Bull* 66:361-364.
- Folgueira M, Anadón R, Yáñez J. 2006. Afferent and efferent connections of the cerebellum of a salmonid, the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a tract-tracing study. *J Comp Neurol* 497:542-565.
- Fonteh AN, Harrington RJ, Tsai A, Liao P, Harrington MG. 2006. Free amino acid and dipeptide changes in the body fluids from Alzheimer's disease subjects. *Amino Acids* 32:213-224.
- Forlano PM, Deitcher DL, Myers DA, Bass H. 2001. Anatomical distribution and cellular basis for high levels of aromatase activity in the brain of teleost fish: aromatase enzyme and mRNA expression identify glia as source. *J Neurosci* 21:8943-8955.
- Frankenhuys-Van den Heuvel THM, Nieuwehuys R. 1984. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the diencephalon and mesencephalon of the trout, *Salmo gairdneri*. Cell bodies, fibers and terminals. *Anat Embryol* 169:193-204.
- Fritsch G. 1878. Untersuchungen über den feineren Bau des Fischgehirns. Mit besonderer Berücksichtigung der Homologies bei anderen Wirbeltierklassen. Gutmann, Berlin.
- Fujita I, Sorensen PW, Stacey NE, Hara TJ. 1991. The olfactory system, not the terminal nerve, functions as the primary chemosensory pathway mediating responses to sex pheromones in male goldfish. *Brain Behav Evol* 38:313-321.
- García JM, Anadón R. 1977. Nuclear distribution of the epithalamus and thalamus of the *Salmo irideus* Gibb. *Trab Inst Cajal Invest Biol*, 36:255-272.

- García-Ovejero D, Azcoitia I, DonCarlos LL, Melcangi RC, García-Segura LM. 2005. Glia-neuron crosstalk in the neuroprotective mechanisms of sex steroid hormones. *Brain Res Rev* 48:273-286.
- Gestrin P, Sterling P. 1977. Anatomy and physiology of goldfish oculomotor system. II. Firing patterns of neurons in abducens nucleus and surrounding medulla and their relation to eye movements. *J Neurophysiol* 40:573-588.
- Giassi AC, Ellis W, Maler L. 2012. Organization of the gymnotiform fish pallium in relation to learning and memory: III. Intrinsic connections. *J Comp Neurol* 520:3369-3394.
- Goehler LE, Finger TE. 1992. Functional organization of vagal reflex systems in the brain stem of the goldfish, *Carassius auratus*. *J Comp Neurol* 319:463-478.
- Goldstein K. 1905. Untersuchungen über das Vorderhirn und Zwischenhirn einigen Knochenfische, nebst einigen Beiträgen über Mittelhirn und kleinhirn derselben. *Arch Jümik Anat und Entw* 66:135-219.
- Gómez -Segade P, Anadón R. 1986. Ciliated neurons of the nucleus praeopticus magnocellularis and nucleus lateralis tuberis of an advanced teleost, *Chelon labrosus* (Risso, 1826). *J Hirnforsch* 27:423-430.
- Gómez -Segade P, Anadón R. 1988. Specialization in the diencephalon of advanced teleosts. *J Morphol* 197:71-103.
- Gómez-Segade P, Anadón R, Gómez-Segade L. 1989. Monoaminergic systems in the hypothalamus of the Acanthopterygian *Chelon labrosus*, with special reference to the organon vasculosum hypothalami. *ActaZool* 70:1-11.
- Gorlick DL. 1989. Motor innervation of respiratory muscles and an opercular display muscle in siamese fighting fish *Betta splendens*. *J Comp Neurol* 290:412-422.
- Gotow T, Triller A, Kom H. 1990. Differential distribution of serotonergic inputs on the goldfish Mauthner cell. *J Comp Neurol* 292:255-268.
- Graf W, Baker R. 1985. The vestibuloocular reflex of the adult flatfish. II.

- Vestibulooculomotor connectivity. *J Neurophysiol* 54:900-916.
- Grandel H, Kaslin J, Ganz J, Wenzel I, Brand M. 2006. Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: origin, proliferation dynamics, migration and cell fate. *Dev Biol* 295:263-277.
- Gregory WA, Tweedle CD. 1985. Horseradish peroxidase evidence for a spinal projection from the preoptic area of the goldfish, a light and electron microscopic study. *Brain Res.* 341: 82-91.
- Grove J, Gadner CR, Richards MH. 1982. Measurement of release of endogenous GABA and catabolites of (3H) GABA from synaptosomal preparations using ion-exchange chromatography. *Neurochem* 7(5):589-599.
- Grover BG, Sharma SC. 1979. Tectal projections in the goldfish (*Carassius auratus*): a degeneration study. *J Comp Neurol* 184:435-454.
- Grover BG, Sharma SC. 1981. Organization of extrinsic tectal connections in goldfish (*Carassius auratus*). *J Comp Neurol* 196:471-488.
- Gulevitsch W. 1911. Hoppe-Seylers. *Z Physiol Chem* 73:434-443.
- Gulevitsch W. 1926. *Zh Russ Fiz-Khim Obsch* 58:610-616.
- Gulevitsch W, Amiradzibi S. 1900. *Ver Disch Chem Ges* 33:1902-1903.
- Guney Y, Turkcu UO, Hicsonmez A, Andrieu MN, Guney HZ, Bilgihan A, Kurtman C. 2006. Carnosine may reduce lung injury caused by radiation therapy. *Med Hypotheses* 66:957-959.
- Guthrie DM. 1990. The physiology of the optic tectum. En: Douglas RH, Djamgoz MBA (Eds). *The visual system of fish*. Chapman and Hall. London, pp:279-343.
- Hackett JT, Faber DS. 1983. Mauthner axon networks mediating supraspinal components of the startle response in the goldfish. *Neurosci* 8:317-331.
- Hackett JT, Buchheim A. 1984. Ultrastructural correlates of electrical-chemical synaptic transmission in goldfish cranial motor nuclei. *J Comp Neurol*

224:425-426.

Harding J, Margolis FL. 1976. Denervation in the primary olfactory pathway of mice. III. Effect on enzymes of carnosine metabolism. *Brain Res* 110:351-360.

Hayle TH. 1973. A comparative study of spinal projections to the brain (except cerebellum) in three classes of poikilothermic vertebrates. *J Comp Neurol* 149:463-476.

Herrick CJ. 1948. The brain of the tiger salamander *Ambystoma tigrinum*. The University of Chicago Press, Chicago, Illinois.

Hipkiss AR. 2005. Could carnosine suppress zinc-mediated proteasome inhibition and neurodegeneration? Therapeutic potential of a non-toxic but non-patentable dipeptide. *Biogerontology* 6:147-149.

Hipkiss AR, Gaunitz F. 2014. Inhibition of tumour cell growth by carnosine: some possible mechanisms. *Amino Acids* 46:327-337.

His W. 1983. Vorschläge zur Einteilung des Gehirns. *Arch Anat Entwicklung* 17:172-179.

Hlavacek M, Tahar M, Libouban S, Szabo T. 1984. The mormyrid brainstem. I. Distribution of brainstem neurones projecting to the spinal cord in *Gnathonemus petersii*, an HRP study. *J Hirnforsch* 6:603-615.

Hoffmann AM, Bakardjiev A, Bauer K. 1996. Carnosine-synthesis in cultures of rat glial cells is restricted to oligodendrocytes and carnosine uptake to astrocytes. *Neurosci Lett* 215:29-32.

Holmqvist BI, Ekström P. 1991. Galanin-like immunoreactivity in the brain of teleosts: distribution and relation to substance P, vasotocin, and isotocin in the Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J Comp Neurol* 306:361-381.

Holmqvist BI, Ekström P. 1995. Hypophysiotrophic systems in the brain of the Atlantic salmon. Neuronal innervations of the pituitary and the origin of pituitary dopamine and nonapeptides identified by means of combined

- carbocyanine tract tracing and immunocytochemistry. *J Chem Neuroanat* 8:125-145.
- Honkanen T, Ekström P. 1990. An immunocytochemical study of the olfactory projections in the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L. *J Comp Neurol* 292:65-72.
- Hope BT, Michael GJ, Knigge KM, Vincent SR. 1991. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci* 88:2811-2814.
- Horinishi H, Grillo M, Margolis FL. 1978. Purification and characterization of carnosine synthetase from mouse olfactory bulbs. *J Neurochem* 31:909-919.
- Hornby PJ, Piekut DT. 1990. Distribution of catecholamine-synthesizing enzymes in goldfish brains: presumptive dopamine and norepinephrine neuronal organization. *Brain Behav Evol* 35:49-64.
- Hsu SM, Raine L. 1981. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 29:1349-1353.
- Huesa G, Anadón R, Yáñez J. 2006. Topography and connections of the telencephalon in a chondrosteian, *Acipenser baeri*: an experimental study. *J Comp Neurol* 497:519-541.
- Ichikawa M. 1975. The central projections of the olfactory tract in the goldfish, *Carassius auratus*. *J Fac Sci Tokyo* 13:257-263.
- Ito H, Kishida R. 1977. Tectal afferent neurons identified by the retrograde HRP method in the carp telencephalon. *Brain Res* 130:142-145.
- Ito H, Kishida R. 1978. Afferent and efferent fiber connections of the carp torus longitudinalis. *J Comp Neurol*, 181:465-476.
- Ito H, Vanegas H. 1983. Cytoarchitecture and ultrastructure of nucleus prethalamicus, with special reference to degenerating afferents from optic tectum and telencephalon, in a teleost (*Holocentrus ascensionis*). *J Comp Neurol*, 221:401-415.

- Ito H, Yoshimoto M. 1990. Cytoarchitecture and fibre connections of the nucleus lateralis valvular in the carp (*Cyprinus carpio*). J Comp Neurol 298:385-399.
- Ito H, Murakami T, Fukuota T, Kishida R. 1986. Thalamic fiber connections in a teleost (*Sebastiscus marmoratus*): visual, somatosensory, octavolateral and cerebellar relay region to the telencephalon. J Comp Neurol 250:215-227.
- Ito H, Yamamoto N, Yoshimoto M, Sawai N, Yang CY, Xue HG, Imura K. 2003. Fiber connections of the *torus longitudinalis* in a teleost: *Cyprinus carpio* re-examined. J Comp Neurol 457:202-211.
- Jackson MC, Lenney JF. 1996. The distribution of carnosine and related dipeptides in rat and human tissues. Inflamm Res 45:132-135.
- Jackson MC, Scollard DM, Mack RJ, Lenney JF. 1994. Localization of a novel pathway for the liberation of GABA in the human CNS. Brain Res Bull 33:379-385.
- Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisén J. 1999. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. Cell 96:25-34.
- Johnston. 1911. The telencephalon of ganoids and teleost. J Comp Neurol 21:489-591.
- Johnston SA, Maler L, Tinner B. 1990. The distribution of serotonin in the brain of *Apteronotus leptorhynchus*: an immunohistochemical study. J Chem Neuroanat 3:429-465.
- Källén B. 1951. Embryological studies on the nuclei and their homologization in the vertebrate forebrain. K Fysiogr Saellsk Handl 62:1-36.
- Kanwal JS, Caprio J. 1987. Central projections of the glossopharyngeal and vagal nerves in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*: clues to differential processing of visceral inputs. J Comp Neurol 264:216-230.
- Kanwal JS, Finger TE, Caprio J. 1988. Forebrain connections of the gustatory system

- in ictalurid fishes. *J Comp Neurol* 278:353-376.
- Kappers CU. 1906. The structure of the teleostean and selachian brain. *J Comp Neurol* 16:1-102.
- Kappers CU, Huber A, Crosby E. 1936. The comparative anatomy of the nervous system of vertebrates, including man. Ed Hafner Publishing Co, New York.
- Kawahara M, Koyama H, Nagata T, Sadakane Y. 2011. Zinc, copper, and carnosine attenuate neurotoxicity of prion fragment PrP106-126. *Metallomics* 3:726-734.
- Kim CH, Ueshima E, Muraoka O, Tanaka H, Yeo SY, Huh TL, Miki N. 1996. Zebrafish elav/HuC homologue as a very early neuronal marker. *Neurosci Lett* 216:109–112.
- Kish SJ, Perry TL, Hansen, S. 1979. Regional distribution of homocarnosine, homocarnosine-carnosine synthetase and homocarnosine in human brain. *J Neurochem* 32:1629-1636.
- Kishida K. 1979. Comparative study on the teleostean optic tectum. Lamination and cytoarchitecture. *J Hirnforsch* 20:57-67.
- Knudsen EI. 1977. Distinct auditory and lateral line nuclei in the midbrain catfishes. *J Comp Neurol* 173:417-431.
- Kosaka T, Hama K. 1979. Ruffed cell: a new type of neuron with distinctive initial unmyelinated portion of the axon in the olfactory bulb of the goldfish (*Carassius auratus*). I. Gogi impregnation and serial thin sectioning studies. *J Comp Neurol* 186:301-319.
- Kosaka T, Hama K. 1981. Ruffed cell: a new type of neuron with distinctive initial unmyelinated portion of the axon in the olfactory bulb of the goldfish (*Carassius auratus*). III. Three-dimensional structure of the ruffed cell dendrite. *J Comp Neurol* 201:571-587.
- Kozan R, Sefil F, Bağirici F. 2008. Anticonvulsant effect of carnosine on penicillin-induced epileptiform activity in rats. *Brain Res* 1239:249-255.

- Kudo H, Ueda H, Kawamura H, Aida K, Yamauchi K. 1994. Ultrastructural demonstration of salmon-type gonadotropin-releasing hormone (sGnRH) in the olfactory system of masu salmon (*Oncorhynchus masou*). *Neurosci Lett* 166:187-190.
- Kumral A, Giriş M, Soluk-Tekkeşin M, Olgaç V, Doğru-Abbasoğlu S, Türkoğlu Ü, Uysal M. 2015. Beneficial effects of carnosine and carnosine plus vitamin E treatments on doxorubicin-induced oxidative stress and cardiac, hepatic, and renal toxicity in rats. *Hum Exp Toxicol*, pp:0960327115597468.
- Lamas I, Anadón R, Díaz-Regueira S. 2007a. Carnosine-like immunoreactivity in neurons of the brain of an advanced teleost, the gray mullet (*Chelon labrosus*, Risso). *Brain Res* 1149:87-100.
- Lamas I, Anadón R, Díaz-Regueira S. 2007b. Distribución del dipéptido carnosina y dipéptidos relacionados, anserina y homocarnosina, en el telencéfalo del pez óseo primitivo *Polypterus senegalus*. Comunicación tipo póster en libro de resúmenes del XII Congreso de la Sociedad Española de Neurociencia. Valencia. ISBN:978-84-370-686-8.
- Lamas I, Díaz-Regueira SM. 2010. Estudio comparado de la distribución de la carnosina y dipéptidos relacionados anserina y homocarnosina en el cerebelo del teleosteo avanzado *Chelon labrosus* R. y los peces cartilaginosos *Scyliorhinus canicula* y *Raja undulata*. Comunicación tipo póster en libro de resúmenes de las VI Jornadas para jóvenes investigadores en neurociencia. A Coruña. I.S.S.N:1886-6786. pp:31.
- Lazár G, Szabo T, Libouban S, Ravaille-Veron M, Toth P, Bräntle K. 1992. Central projections and motor nuclei of the facial, glossopharyngeal and vagus nerves in the mormyrid fish *Gnathonemus petersii*. *J Comp Neurol* 325:343-358.
- Le Gross Clark WE. 1938. The hypothalamus: morphological, functional, clinical and surgical aspects. Oliver GB (Ed.). London y Edinburgh.
- Leigh PN, Connick JH, Stone TW. 1990. Distribution of NADPH-diaphorase positive cells in the rat brain. *Comp Biochem Physiol C* 97:259-264.

- Lenney JF, Peppers SC, Kucera CM, Sjaastad Q. 1983. Homocarnosinosis: lack of serum carnosinase is the defect probably responsible for elevated brain and Cfs homocarnosine. *Clin Chim Acta* 132:157-165.
- Levine RL, Dethier S. 1985. The connections between the olfactory bulb and the brain in the goldfish. *J Comp Neurol* 237:427-444.
- López JM, González A. 2002. Ontogeny of NADPH diaphorase/nitric oxide synthase reactivity in the brain of *Xenopus laevis*. *J Comp Neurol* 445:59-77.
- Luiten PGM. 1976. A somatotopic and functional representation of the respiratory muscles in the trigeminal and facial motor nuclei of the carp (*Cyprinus carpio* L.). *J Comp Neurol* 166:191-200.
- Luiten PGM. 1979. Proprioceptive reflex connections of head musculature and the mesencephalic trigeminal nucleus in the carp. *J Comp Neurol* 183:903-912.
- Luiten PGM. 1981. Afferent and efferent connections of the optic tectum in the carp (*Cyprinus carpio* L.) *Brain Res* 220:51-65.
- Luiten PGM, Van der Pers JNC. 1977. The connections of the trigeminal and facial motor nuclei in the brain of the carp (*Cyprinus carpio* L.) as revealed by anterograde and retrograde transport of HRP. *J Comp Neurol* 174:575-590.
- Luque MA, Pérez-Pérez MP, Herrero L, Torres B. 2008. Afferent and efferent connections of the mesencephalic reticular formation in goldfish. *Brain Res Bull* 75:480-484.
- Ma PM. 1994. Catecholaminergic systems in the zebrafish. II. Projection pathways and pattern of termination of the *locus coeruleus*. *J Comp Neurol* 344:256-269.
- Manso MJ, Becerra M, Molist P, Rodríguez-Moldes I, Anadón R. 1993. Distribution and development of catecholaminergic neurons in the brain of the brown trout. A tyrosine hydroxylase immunohistochemical study. *J Hirnforsch* 34:239-260.
- Manso MJ, Becerra M, Anadón R. 1997. Expression of a low-molecular-weight (10

- kDa) calcium binding protein in glial cells of the brain of the trout (Teleostei). *Anat Embryol* 196:403-416.
- Mansour-Robaey S, Pinganaud G. 1990. Quantitative and morphological study of cell proliferation during morphogenesis in the trout visual system. *J Hirnforsch* 31:495-504.
- Margolis FL. 1974. Carnosine in the primary olfactory pathway. *Science* 184:909-911.
- Margolis FL. 1978. Carnosine. *Trends Neurosci.* 1:21-44.
- Margolis FL. 1980. Carnosine: an olfactory neuropeptide. In the role of peptides in neuronal function. Baker JL, Smith T. (Eds). Dekker, New York, pp:545-572.
- Margolis FL, Grillo M. 1984. Carnosine, homocarnosine and anserine in vertebrate retinas. *Neurochem Int* 6:207-209.
- Martyniuk CJ, Chang JP, Trudeau VL. 2007. The effects of GABA agonists on glutamic acid decarboxylase, GABA-transaminase, activin, salmon gonadotrophin-releasing hormone and tyrosine hydroxylase mRNA in the goldfish (*Carassius auratus*) neuroendocrine brain. *J Neuroendocrinol* 19:390-396.
- Matsutani S, Uchiyama H, Ito H. 1986. Cytoarchitecture, synaptic organization and fiber connections of the nucleus olfactoretinalis in a teleost *Navodon modestus*. *Brain Res* 373:126-138.
- Matz SP. 1995. Connection of the olfactory bulb in the chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J Comp Neurol* 345:214-223.
- Mccormick CA. 1983. Central connections of the octavolateralis nerves in the pike cichlid, *Crenicichla lepidota*. *Brain Res* 263:177-185.
- Mccormick CA, Braford MR. 1993. The primary octaval nuclei and inner ear afferent projections in the otophysan *Ictalurus punctatus*. *Brain Behav Evol* 42:48-68.

- Mccormick CA, Braford MR. 1994. Organization of inner ear endorgan projections in the goldfish, *Carassius auratus*. Brain Behav Evol 43:189-205.
- Mcfarland GA, Holliday R. 1999. Further evidence for the rejuvenating effects of the dipeptide L-carnosine en cultured human diploid fibroblast. Exp Gerontol 34:35-45.
- Meek J. 1981a. A Golgi-electronmicroscopic study of goldfish optic tectum. I. Description of afferents, cell types and synapses. J Comp Neurol 199:149-173.
- Meek J. 1981b. A Golgi-electronmicroscopic study of goldfish optic tectum. II: Quantitative aspets of synaptic organization. J Comp Neurol 199:175-190.
- Meek J. 1990. Tectal morphology: connections, neurons and synapses. En: Douglas RH, Djamgoz MBA (Eds). The visual system of fish. Chapman and Hall, London, pp:239-277.
- Meek J. 1992. Why run parallel fibers parallel?. Teleostean Purkinje cells as possible coincidence detectors in a timing device subserving spatial of temporal differences. Neurosci 48:249-283.
- Meek J. 1998. The central nervous system of vertebrates. II. Nieuwenhuys R, Ten Donkelaar HJ, Nicholson CW (Eds). New York, Springer, pp:760-1524.
- Meek J, Schellart NAM. 1978. A Golgi study of goldfish optic tectum. J Comp Neurol 182:89-122.
- Meek J, Joosten HWJ. 1993. Tyrosine hydroxylase-immunoreactive cell groups in the brain of the teleost fish *Gnathonemus petersii*. J Chem Neuroanat 6:431-446.
- Meek J, Nieuwenhuys R. 1998. Holosteans and teleosts. II. Specialised part. En: The Central Nervous System of Vertebrates. Nieuwenhuys R, Ten Donkelaar HJ, Nicholson CW (Eds). New York, Springer, pp:759-936.
- Meek J, Nieuwenhuys R, Elsevier D. 1986a. Afferent and efferent connections of the cerebellar lobe C1 of the mormyrid fish *Gnathonemus petersii*: an HRP

- study. J Comp Neurol 245:319-341.
- Meek J, Nieuwenhuys R, Elsevier D. 1986b. Afferent and efferent connections of cerebellar lobe C3 of the mormyrid fish *Gnathonemus petersii*: an HRP study. J Comp Neurol 245:342-358.
- Meek J, Joosten HWJ, Steinbusch HWM. 1989. The distribution of dopamine-immunoreactivity in the brain of the mormyrid teleost *Gnathonemus petersii*. J Comp Neurol 281:362-383.
- Meek J, Hafmans TGM, Maler L, Hawkes R. 1992. The distribution of zebrin II in the gigantocerebellum of the mormyrid fish *Gnathonemus petersii* compared with other teleosts. J Comp Neurol 316:17-31.
- Menuet A, Anglade I, Le Gueve, R, Pellegrini E, Pakdel F, Kah O. 2003. Distribution of aromatase mRNA and protein in the brain and pituitary of female rainbow trout: Comparison with estrogen receptor alpha. J Comp Neurol 462:180-193.
- Merchenthaler I, Görös T, Sétáló G, Petrusz P, Flerkó B. 1984. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons and pathways in the rat brain. Cell Tissue Res 237:15-29.
- Meredith GE. 1985. The distinctive central utricular projections in the herring. Neurosci Lett 55:191-196.
- Meredith GE. 1988. Comparative view of the central organization of afferent and efferent circuitry for the inner ear. Acta Biol Hung 39:229-249.
- Meredith GE, Roberts BL, Maslam S. 1987. Distribution of afferent fibers in the brainstem from end organs in the ear and lateral line in the European eel. J Comp Neurol 265:507-520.
- Meyer DL, Lara J, Malz CR, Graf W. 1993. Diencephalic projections to the retina in two species of flatfishes (*Scophthalmus maximus* and *Pleuronectes platessa*). Brain Res 601:308-312.
- Miller RN. 1940. The diencephalic cell mass of the teleost, *Corydora paliiatus*. J

Comp Neurol 73:345-378.

Min J, Senut MC, Rajanikant K, Greenberg E, Bandagi R, Zemke D, Mousa A, Kassab M, Farooq MU, Gupta R, Majid A. 2008. Differential neuroprotective effects of carnosine, anserine, and N-acetyl carnosine against permanent focal ischemia. *J Neurosci Res* 86:2984-2991.

Miyamura Y, Nakayasu H. 2001. Zonal distribution of Purkinje cells in the zebrafish cerebellum: analysis means of a specific monoclonal antibody. *Cell Tissue Res* 305(5):299-305.

Mizuno D, Konoha-Mizuno K, Mori M, Sadakane Y, Koyama H, Ohkawara S, Kawahara M. 2015. Protective activity of carnosine and anserine against zinc-induced neurotoxicity: a possible treatment for vascular dementia. *Metallomics* 7:1233-1239.

Molist P, Rodríguez-Moldes I, Anadón R. 1993. Organization of catecholaminergic systems in the hypothalamus of two elasmobranch species, *Raja undulata* and *Scyliorhinus canicula*. A histofluorescence and immunohistochemical study. *Brain Behav Evol* 41:290-302.

Morita Y, Finger TE. 1985a. Reflex connections of the facial and vagal gustatory systems in the brainstem of the bullhead catfish, *Ictalurus nebulosus*. *J Comp Neurol* 231:547-558.

Morita Y, Finger TE. 1985b. Topographic and laminar organization of the vagal gustatory system in the goldfish, *Carassius auratus*. *J Comp Neuro* 238:187-201.

Morita Y, Finger TE. 1987a. Area postrema of the goldfish, *Carassius auratus*: ultrastructure, fiber connections, and immunocytochemistry. *J Comp Neurol* 256:104-116.

Morita Y, Finger TE. 1987b. Topographic representation of the sensory and motor roots of the vagus nerve in the medulla of goldfish, *Carassius auratus*. *J Comp Neurol* 264:231-249.

- Morita Y, Ito H, Masai H. 1980. Central gustatory paths in the crucian carp, *Carassius carassius*. J Comp Neurol 191:119-132.
- Morita Y, Murakami T, Ito H. 1983. Cytoarchitecture and topographic projections of the gustatory centers in a teleost, *Carassius carassius*. J Comp Neurol 218:378-394.
- Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D, Weiss S, van der Kooy D. 1994. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. Neuron 13:1071-1082.
- Mroz EA, Sewell WF. 1989. Pharmacological alterations of the activity of afferent fibers innervating hair cells. Hear Res 38:141-62.
- Mueller T, Wullimann MF. 2002. BrdU-, neuroD (nrd)- and Hu-studies reveal unusual non-ventricular neurogenesis in the postembryonic zebrafish forebrain. Mech Dev 117:123-135.
- Mueller T, Guo S. 2009. The distribution of GAD67-mRNA in the adult zebrafish (teleost) forebrain reveals a prosomeric pattern and suggests previously unidentified homologies to tetrapods. J Comp Neurol 516:553-568.
- Münz H, Stumpf WE, Jennes L. 1981. LHRH systems in the brain platyfish. Brain Res 221:1-13.
- Münz H, Class B, Stumpf WE, Jennes L. 1982. Centrifugal innervations of the retina by luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-immunoreactive telencephalic neurons in teleost fishes. Cell Tissue Res 222:313-323.
- Murakami T, Ito H. 1985. Long ascending projection of the spinal dorsal horn in a teleost, *Sebasticus marmoratus*. Brain Res 346:168-170.
- Murakami T, Morita Y. 1987. Morphology and distribution of the projection neurons in the cerebellum in a teleost: *Sebasticus marmoratus*. J Comp Neurol 256:607-623.
- Murakami T, Morita Y, Ito H. 1983. Extrinsic and intrinsic fiber connections of the

- telencephalon in a teleost, *Sebasticus marmoratus*. J Comp Neurol 216:115-131.
- Murakami T, Fukuota T, Ito H. 1986a. Telencephalic ascending acusticolateral system in a teleosts (*Sebasticus marmoratus*), with special reference to the fiber connections of the nucleus preglomerulosus. J Comp Neurol 247:383-397.
- Murakami T, Morita Y, It, H. 1986b. Cytoarchitecture and fiber connections of the superficial pretectum in a teleost, *Navodon modestus*. Brain Res 373:213-221.
- Neidle A, Kander J. 1974. Carnosine: an olfactory bulb peptide. Brain Res 80:359-364.
- Nelson JS. 2006. Fishes of the world. John Wiley & Sons, Inc. (USA). 4th Edition.
- Ng RH, Marshall FD, Henn FA, Sellström A. 1977. Metabolism of carnosine and homocarnosine in subcellular fractions and neuronal and glial cell-enriched fractions of rabbit brain. J Neurochem 28:449-452.
- Nieuwenhuys R. 1963. The comparative anatomy of the actinopterygian forebrain. J Hirnforsch, 6:171-200.
- Nieuwenhuys R. 1964. Comparative anatomy of the spinal cord. Prog Brain Res, 11:1-57.
- Nieuwenhuys R, Bodenheimer TS. 1966. The diencephalon of the primitive bony fish *Polypterus* in the light of the problem of homology. J Morphol 117:415-450.
- Nieuwenhuys R, Pouwels E. 1983. The brain stem of actinopterygian fishes. En: Northcutt RG, Davis RE (Eds). Fish Neurobiology. I. Brain stem and sense organs. University of Michigan Press, Ann Arbor, pp:25-87.
- Nieuwenhuys R, Meek J. 1990. The telencephalon of actinopterygian fishes. En: Jones EG, Peters A. (Eds). Comparative structure and evolution of cerebral cortex, I. Plenum New York, pp:31-73.

- Nieuwenhuys R, Pouwels E, Smulders-Kersten E. 1974. The neuronal organization of cerebellar lobe C1 in the mormyrid fish *Gnathonemus petersii* (Teleostei). *Z Anat Entwickl Gesch* 144:315-336.
- Niida A, Ohno T. 1984. An extensive projection of fish dorsolateral tegmental cells to the optic tectum revealed by intra-axonal dye marking. *Neurosci Lett* 48:261-266.
- Nilsson S. 1980. Sympathetic nervous control of the iris sphincter of the Atlantic cod, *Gadus morhua*. *J Comp Physiol* 138:149-155.
- Northcutt RG. 2006. Connections of the lateral and medial divisions of the goldfish telencephalic pallium. *J Comp Neurol* 494:903-943.
- Northcutt RG, Bradford MR. 1980. New observations on the organization and evolution of the telencephalon of actinopterygian fishes. En: Ebbenson SOE (ed). *Comparative Neurology of the telencephalon*. Plenum, New York, pp: 41-98.
- Northcutt RG, Wullimann MF. 1988. The visual system in teleosts fishes: morphological patterns and trends. In: Atema J, Fay RR, Poppema AN, Tavalga WN (Eds), *Sensory biology of aquatic animals*. Springer, New York, pp:515-552.
- Northcutt RG, Butler AB. 1993. The diencephalon of the pacific herring, *Clupea harengus*: retinofugal projections to the diencephalon and optic tectum. *J Comp Neurol* 328:547-561.
- Northmore DPM. 1984. Visual and saccadic activity in the goldfish *torus longitudinalis*. *J Comp Physiol* 155:333-340.
- Northmore DPM, Williams B, Vanegas H. 1983. The teleostean torus longitudinalis: responses related to eye movements; visuotopic mapping, and functional relations with the optic tectum. *J. Comp. Physiol (A)* 150:39-50.
- Oka Y. 1980. The origin of the centrifugal fibers to the olfactory bulb in the goldfish, *Carassius auratus*: An experimental study using the fluorescent dye

- primuline as a retrograde tracer. *Brain Res* 185:225.
- Oka Y, Satou M, Ueda K. 1986a. Descending pathways to the spinal cord in the himé salmon (landlocked red salmon, *Oncorhynchus nerka*). *J Comp Neurol* 254:91-103.
- Oka Y, Satou M, Ueda K. 1986b. Ascending pathways from the spinal cord in the himé salmon (landlocked red salmon, *Oncorhynchus nerka*). *J Comp Neurol* 254:104-112.
- Okano HJ, Darnell .B. 1997. A hierarchy of Hu RNA binding proteins in developing and adult neurons. *J Neurosci* 17:3024–3037.
- Olivereau M, Olivereau J, Vandesande F. 1990. Localization of growth-hormone-releasing factor-like immunoreactivity in the hypothalamo-hypophysial system of some teleost species. *Cell Tissue Res* 259:73-80.
- Onishi K. 1987. Proposed tertiary olfactory pathways in teleosts, *Carassius auratus*. *Zool Sci* 4:427-431.
- Ota D, Downing JE, Cook JE. 1999. Neuronal and glial cell types revealed by NADPH-diaphorase histochemistry in the retina of a teleost fish, the grass goby (*Zosterisessor ophiocephalus*, Perciformes, Gobiidae). *Anat Embryol* 200:487-494.
- Palmgren A. 1921. Embryological and morphological studies on the midbrain and cerebellum of vertebrates. *Acta Zool* 2:1-94.
- Panzanelli P, Valli P, Cantino D, Fasolo A. 1994. Glutamate and carnosine in the vestibular system of the frog. *Brain Res* 662:293-296.
- Panzanelli P, Cantino D, Sassoe-Pognetto M. 1997. Colocalization of carnosine and glutamate in photoreceptors and bipolar cells of the frog retina. *Brain Res* 758:143-152.
- Park HC, Hong SK, Kim HS, Kim SH, Yoon EJ, Kim CH, Miki N, Huh TL. 2000. Structural comparison of zebrafish Elav/Hu and their differential expressions during neurogenesis. *Neurosci Lett* 279:81–84.

- Parrilla M, Lillo C, Herrero-Turrión MJ, Arévalo R, Aijón J, Lara JM, Velasco A. 2013. Pax2+ astrocytes in the fish optic nerve head after optic nerve crush. *Brain Res* 1492:18-32.
- Pastor AM, Torres B, Delgado-García JM, Baker R. 1991. Discharge characteristics of medial rectus and abducens motoneurons in the goldfish. *J Neurophysiol* 66:2125-2140.
- Peretto P, Bonfanti L, Merighi A, Fasolo A. 1998. Carnosine-like immunoreactivity in astrocytes of the glial tubes and in newly-generated cells within the tangential part of the rostral migratory stream of rodents. *Neurosci* 85:527-542.
- Peretto P, Merighi A, Fasolo A, Bonfanti L. 1999. The subependymal layer in rodents: a site of structural plasticity and cell migration in the adult mammalian brain. *Brain Res Bull* 49:221-243.
- Pérez SE, Adrio F, Rodríguez MA, Rodríguez-Moldes I, Anadón R. 1996. NADPH-diaphorase histochemistry reveals oligodendrocytes in the rainbow trout (teleosts). *Neurosci Lett* 205:83-86.
- Pérez SE, Yáñez J, Marín O, Anadón R, González A, Rodríguez-Moldes I. 2000. Distribution of choline acetyl transferase (ChAT) immunoreactivity in the brain of the adult trout and trac-tracing observations on the connections of the nuclei of the isthmus. *J Comp Neurol* 428:450-474.
- Peter RE, Gill VE. 1975. A stereotaxic atlas and technique for forebrain nuclei of the goldfish, *Carassius auratus*. *J Comp Neurol* 159:69-102.
- Peter RE, Fryer JN. 1983. Endocrine functions of the hypothalamus of actinopterygians. En: Davis RE, Northcutt RG (Eds). *Fish Neurobiology. II. Higher brain areas and functions*. University of Michigan Press. Ann Arbor, pp:165-201.
- Pinganaud G. 1980. Le development du système visual primaire de *Salmo irideus*. *Arch d'Anat Microscopie Morphol Experiment* 69:125-231.

- Pisano JJ, Wilson JD, Cohen L, Abraham D, y Udenfriend J. 1961. Isolation of γ -aminobutyrylhistidine (homocarnosine) from brain. *J Biol Chem* 236:499-502.
- Pouwels E. 1978a. On the development of the cerebellum of the trout, *Salmo gairdneri*. I. Patterns of the cell migration. *Anat Embryol* 152:291-308.
- Pouwels E. 1978b. On the development of the cerebellum of the trout, *Salmo gairdneri*. II. Early development. *Anat Embryol* 152:309-324.
- Pouwels E. 1978c. On the development of the cerebellum of the trout, *Salmo gairdneri*. III. Development of neuronal elements. *Anat Embryol* 153:37-54.
- Pouwels E. 1978d. On the development of the cerebellum of the trout, *Salmo gairdneri*. IV. Development of the pattern of connectivity. *Anat Embryol* 153:55-65.
- Pouwels E. 1978e. On the development of the cerebellum of the trout, *Salmo gairdneri*. V. Neuroglial cells and their development. *Anat Embryol* 153:67-83.
- Prasada-Rao PD, Finger TE. 1984. Asymmetry of the olfactory system in the brain of the winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *J Comp Neurol* 225:492-510.
- Prasada-Rao PD, Jadhao AG, Y Sharma SC. 1987. Descending projection neurons to the spinal cord of the goldfish. *J Comp Neurol* 265:96-108.
- Prasada-Rao PD, Jadhao AG, Sharma SC. 1993. Topographic organization of descending projection neurons to the spinal cord of the goldfish *Carassius auratus*. *Brain Res*, 620:211-220.
- Preston JE, Hipkiss AR, Himsforth DT, Romero IA, Abbott JN. 1998. Toxic effects of beta-amyloid (25-35) on immortalized rat brain endothelial cell: protection by carnosine, homocarnosine and beta-alanine. *Neurosci Lett* 242:105-108.
- Quintana-Urzainqui I, Rodríguez-Moldes I, Candal E. 2014. Developmental, tract-tracing and immunohistochemical study of the peripheral olfactory system

- in a basal vertebrate: insights on Pax6 neurons migrating along the olfactory nerve. *Brain Struct Funct* 219:85-104.
- Rama Krishna NS, Subhedar N. 1991. Cytoarchitectonic pattern of the hypothalamus in the catfish, *Clarias batrachus* (Linn.). *J Hirnforsch* 3:289-308.
- Rama Krishna NS, Subhedar N, Schereibman MP. 1992. FMRF-amide-like immunoreactive nervus terminalis innervations to the pituitary in the carfish, *Clarias batrachus* (Linn.): demonstration by lesion and immunocytochemical techniques. *Gen Comp Endocrinol* 85:111-117.
- Reaves TA, Hayward JN. 1979. Isotocinergic neurons in the goldfish hypothalamus: physiological and morphological studies on chemically identified cells. *Cell Tissue Res* 202:17-23.
- Reaves TA, Hayward JN. 1980. Functional and morphological studies of peptide-containing neuroendocrine cells in goldfish hypothalamus. *J Comp Neurol* 193:777-788.
- Rhodes KJ, Zottoli SJ, Mufson EJ. 1986. Choline acetyltransferase immunohistochemical staining in the goldfish (*Carassius auratus*) brain: evidence that the Mauthner cell does not contain choline acetyltransferase. *Brain Res* 381:215-224.
- Rink E, Wullimann MF. 1998. Some forebrain connections of the gustatory system in the goldfish *Carassius auratus* visualized by separate DiI application to the hypothalamic inferior lobe and the torus lateralis. *J Comp Neurol* 394:152-170.
- Rink E, Wullimann MF. 2002. Connections of the ventral telencephalon and tyrosine hydroxylase distribution in the zebrafish brain (*Danio rerio*) lead to identification of an ascending dopaminergic system in a teleost. *Brain Res Bull* 57:385-387.
- Rink E, Wullimann MF. 2004. Connections of the ventral telencephalon (subpallium) in the zebrafish (*Danio rerio*). *Brain Res* 1011:206-220.

- Roberts BL. 1992. Neural mechanisms underlying escape behaviour in fishes. *Rev Fish Biol Fisk* 2:243-266.
- Roberts PR, Zaloga GP. 2000. Cardiovascular effects of carnosine. *Biochemistry (Mosc)* 65:856-861.
- Rodríguez-Moldes I, Carrera I, Pose-Méndez S, Quintana-Urzainqui I, Candal E, Anadón R, Mazan S, Ferreiro-Galve S. 2011. Regionalization of the shark hindbrain: a survey of an ancestral organization. *Front Neuroanat* 5:16.
- Rooney D, New JG, Szabo T, Ravaille-Veron M, 1989. The central connections of the olfactory bulbs in the weakly electric fish *Gnathonemus petersii*. *Cell Tissue Res* 257:423-436.
- Rowe JS, Beauchamp RD. 1982. Visual responses of nucleus corticalis neurons in the perciform teleost, northern rock bass (*Ambloplites rupestris*). *Brain Res* 236:205-209.
- Sakai M, Yoshida M, Karasawa N, Teramura M, Ueda H, y Nagatsu I. 1987. Carnosine-like immunoreactivity in the primary olfactory neuron of the rat. *Experientia* 43:298-300.
- Sakai M, Ashihara M, Nishimura T, Nagatsu I. 1990. Carnosine-like immunoreactivity in human olfactory mucosa. *Acta Otolaryngol* 109:450-453.
- Sakamoto N, Ito H. 1982. Fiber connections of the corpus glomerulosum in a teleost, *Navodon modestus*. *J Comp Neurol* 205:291-298.
- Saldaña CJ, Tuerk MJ, Kim YH, Fernández AO, Arnold AP, Schlinger BA. 2000. Distribution and regulation of telencephalic aromatase expression in the zebra finch revealed with a specific antibody. *J Comp Neurol* 423, 619-630.
- Sandri C, Akert K, Kristol C, Van Buren JM, Bennett MVL. 1976. AChE-positive and -negative motoneurons in the spinal cord of *Sternarchus albifrons*. *Brain Res* 111:157-161.
- Sas E, Maler L, Tinner B. 1990. Catecholaminergic systems in the brain of a

- gymnotiform teleost fish: an immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 292:127-162.
- Sassoe-Pognetto M, Cantino D, Fasolo A. 1992. Carnosine-like immunoreactivity is associated with synaptic vesicles in photoreceptors of the frog retina. *Brain Res* 578:261-268.
- Scherer-Singler U, Vincent SR, Kimura H, McGeer EG. 1983. Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. *J Neurosci Methods* 9:229-234.
- Schnitzlein HN. 1962. The habenula and the dorsal thalamus of some teleosts. *J Comp Neurol* 118:225-268.
- Senut MC, Azher S, Margolis FL, Patel K, Mousa A, Majid A. 2009. Distribution of carnosine-like peptides in the nervous system of developing and adult zebrafish (*Danio rerio*) and embryonic effects of chronic carnosine exposure. *Cell Tissue Res* 337:45-61.
- Shao L, Li QH, Tan Z. 2004. L-carnosine reduces telomere damage and shortening rate in cultured normal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 324:931-936.
- Sharma SC, Berthoud VM, Breckwold R. 1989. Distribution of substance P-like immunoreactivity in the goldfish brain. *J Comp Neurol* 279:104-116.
- Sheldon RE. 1912. The olfactory tracts and centers in teleosts. *J Comp Neurol* 22:177-339.
- Shen Y, Yang J, Li J, Shi X, Ouyang L, Tian Y, Lu J. 2014. Carnosine inhibits the proliferation of human gastric cancer SGC-7901 cells through both of the mitochondrial respiration and glycolysis pathways. *PLoS One*, 9: e104632 doi: 10.1371/journal.pone.0104632
- Shiga T, Oka Y, Satou M, Okumoto N, Ueda K. 1985a. Efferents from the supracommissural ventral telencephalon in the hime salmon (landlocked red salmon, *Oncorhynchus nerka*): an anterograde degeneration study. *Brain*

Res Bull 14:55-61.

Shiga T, Oka Y, Satou M, Okumoto N, Ueda K. 1985b. An HRP study of afferent connections of the supracommissural ventral telencephalon and the medial preoptic area in hime salmon (landlocked red salmon, *Oncorhynchus nerka*). Brain Res 364:162-177.

Sibbing FA, 1984. Food handling and mastication in the carp (*Cyprinus carpio*). PhD thesis, Wageningen, Netherlands.

Skaper SD, Das S, Marshall FD. 1973. Some properties of a homocarnosine-carnosine synthetase isolated from rat brain. J Neurochem 21:1429-1445.

Sligar CM, Voneida TJ. 1976. Tectal efferents in the blind cave fish, *Astyanax hubbsi*. J Comp Neurol 165:107-124.

Sorensen PW, Hara TJ, Stacey NE. 1991. Sex pheromones selectively stimulate the medial olfactory tracts of male goldfish. Brain Res 558:343-347.

Springer AD. 1983. Centrifugal innervations of goldfish retina from ganglion cells of the nervus terminalis. J Comp Neurol 214:404-415.

Stem WK, Walker SE, Chohan KS, Ball AK. 1984. The goldfish nervus terminalis: a luteinizing hormone-releasing hormone and molluscan cardioexcitatory peptide immunoreactive olfactoretinal pathway. Proc Natl Acad Sci USA, 81:940-944.

Sterling P. 1977. Anatomy and physiology of goldfish oculomotor system. I. Structure of abducens nucleus. J Neurophysiol 40:557-572.

Striedter GF. 1990a. The diencephalon of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. I. Nuclear organization. Brain Behav Evo 36:329-354.

Striedter GF. 1990b. The diencephalon of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. II. Retinal, tectal, cerebellar and telencephalic connections. Brain Behav Evol 36:355-377.

Striedter GF. 1991. Auditory, electrosensory and mechanosensory lateral line

- pathways through the forebrain in channel catfishes. *J Comp Neurol* 312:311-331.
- Sueiro C, Carrera I, Molist P, Rodríguez-Moldes I, Anadón R. 2004. Distribution and development of glutamic acid decarboxylase immunoreactivity in the spinal cord of the dogfish *Scyliorhinus canicula* (elasmobranchs). *J Comp Neurol* 478:189-206.
- Szabo T, Lazár G, Libouban S, Toth P, Ravaille M. 1987. Oculomotor system of the weakly electric fish *Gnathonemus petersii*. *J Comp Neurol* 264:480-493.
- Szcześniak D, Budzeń S, Kopeć W, Rymaszewska J. 2014. Anserine and carnosine supplementation in the elderly: Effects on cognitive functioning and physical capacity. *Arch Gerontol Geriatr* 59:485-490.
- Tapanes-Castillo A, Shabazz FS, Mboge MY, Vajn K, Oudega M, Plunkett JA. 2014. Characterization of a novel primary culture system of adult zebrafish brainstem cells. *J Neurosci Methods* 223:11-19.
- Tolkatschevskaya N. 1929. Hoppe-Seyler Z *Physiol Chem* 185:538.
- Torres B, Pastor AM, Cabrera B, Salas C, Delgado-García JM. 1992. Afferents to the oculomotor nucleus in the goldfish (*Carassius auratus*) as revealed by retrograde labeling with horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 324:449-461.
- Trexler ET, Smith-Ryan AE, Stout JR, Hoffman JR, Wilborn CD, Sale C, Kreider RB, Jäger R, Earnest CP, Bannock L, Campbell B, Kalman D, Ziegenfuss TN, Antonio J. 2015. International society of sports nutrition position stand: Beta-Alanine. *J Soc Sports Nutr* 12:30.
- Tsuji S. 1975. Histochemical demonstration of acetylcholinesterase-rich cells in spinal electromotor nucleus of *Electrophorus electricus*. *Brain Res* 88:499-501.
- Uchiyama H, Matsutani S, Ito H. 1988. Pretectum and accessory optic systems in the filefish *Navodon modestus* (Balistidae, Teleostei) with special reference to

- visual projections to the cerebellum and oculomotor nuclei. *Brain Behav Evol* 31:170-180.
- Uchiyama H. 1990. Immunohistochemical localization subpopulations of retinopetal neurons in the nucleus olfactoretinalis in a teleost, the whitespotted greenling (*Hexagrammos stelleri*). *J Comp Neurol* 293:34-62.
- Van den Dungen HM, Buijs RM, Pool CW, Terlouw M. 1982. The distribution of vasotocin and isotocin in the brain of the rainbow trout. *J Comp Neurol* 212:146-157.
- Vanegas H, Ito H. 1983. Morphological aspects of the teleostean visual system: a review. *Brain Res Rev* 6:117-137.
- Vanegas H, Laufer M, Amat J. 1974. The optic tectum of a perciform teleost. I. General configuration and cytoarchitecture. *J Comp Neurol* 154:43-60.
- Vecino E, Coveñas R, Alonso JR, Lara J, Aijón J. 1989. Immunocytochemical study of substance P-like cell bodies and fibres in the brain of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J Anat* 165:191-200.
- Vecino E, Piñuela C, Arévalo R, Lara J, Alonso R, Aijón J. 1992. Distribution of enkephalin-like immunoreactivity in the central nervous system of the rainbow trout: an immunocytochemical study. *J Anat* 180:435-453.
- Veney SL, Rissman EF. 2000. Immunolocalization of androgen receptors and aromatase enzyme in the adult musk shrew brain. *Neuroendocrinology*, 72:29-36.
- Vigh-Teichmann I, Vigh B. 1989. The cerebrospinal fluid-contacting neuron: a peculiar cell type of the central nervous system. Immunocytochemical aspects. *Arch Histol Cytol* 52:195-207.
- Vigh B, Vigh-Teichmann I, Aros B, Varjassy P. 1972. Light and electron microscopic studies of the vascular sac and of the nervous and of the tractus sacculi vasculosi. *Z Zellforsch* 129:508-522.
- Villani L, Battistini S, Bissoli R, Contestabile A. 1987. Cholinergic projections in the

- telencephalo-habenular interpeduncular system of the goldfish. *Neurosci Lett* 76:263-268.
- Villani L, Guarnieri T, Salsi U, Bollini D. 1991. Substance P in the habenulo-interpeduncular system of the goldfish. *Brain Res Bull* 26:225-228.
- Villani L, Guarnieri T, Zironi I. 1994a. Choline acetyltransferase and NADPH-diaphorase localization in the goldfish habenulo-interpeduncular system. *Neurosci Lett* 173:67-70.
- Villani L, Dipietrangelo L, Pallotti C, Pettazzoni P, Zironi I, Guarnieri T. 1994b. Ultrastructural and immunohistochemical study of the telencephalon-habenulo-interpeduncular connections in the goldfish. *Brain Res Bull* 34:1-5.
- Villari V, Attanasio F, Micali N. 2014. Control of the structural stability of α -crystallin under thermal and chemical stress: the role of carnosine. *J Phys Chem B* 118:13770-13776.
- Wakamatsu Y, Weston JA. 1997. Sequential expression and role of Hu RNA-binding proteins during neurogenesis. *Development* 124:3449-3460.
- Wathey JC. 1988. Identification of the teleost Edinger-Westphal nucleus by retrograde horseradish peroxidase labeling and by electrophysiological criteria. *J Comp Physiol* 162:511-524.
- Weller TH, Coons AH. 1954. Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med* 86:789-794.
- Wideman J, Brink L, Stein S. 1978. New automated fluorometric peptide microassay for carnosine in mouse olfactory bulb. *Anal Biochem* 86:670-678.
- Wong CJ. 1997. Connections of the basal forebrain of the weakly electric fish, *Eigenmannia virescens*. *J Comp Neurol* 389:49-64.
- Wullimann MF. 1994. The teleostean torus longitudinalis: a short review on its structure, histochemistry, connectivity, possible function and phylogeny. *Eur. J Morphol* 32, 235-242.

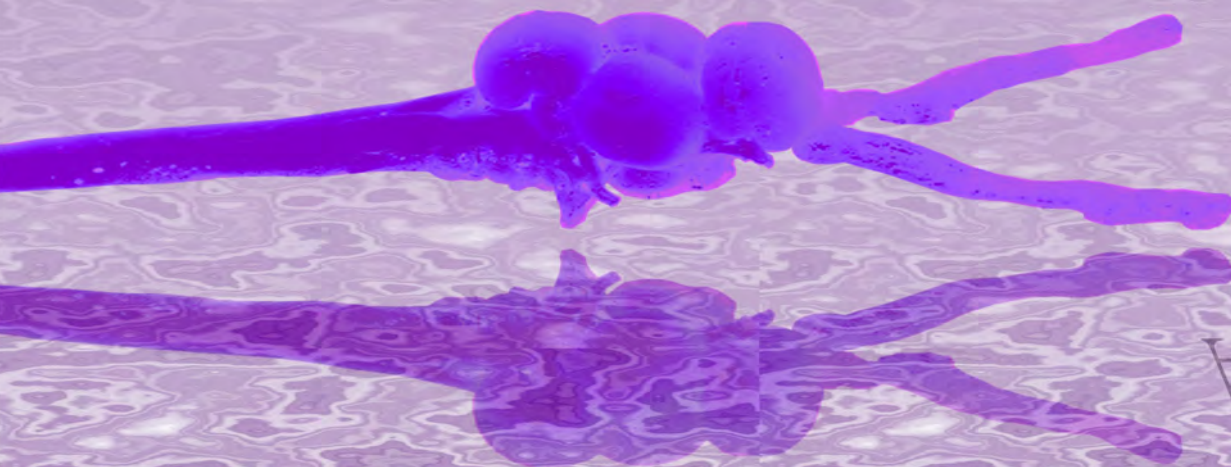
- Wullimann MF, Northcutt RG. 1988. Connections of the corpus cerebelli in the green sunfish and the common goldfish: a comparison of cypriniform teleosts. *Brain Behav Evol* 32, 293-316.
- Wullimann MF, Northcutt RG. 1989. Afferent connections of the valvula cerebelli in two teleosts, the common goldfish and the green sunfish, *J Comp Neurol* 289:554-567.
- Wullimann MF, Meyer DL. 1990. Phylogeny of putative cholinergic visual pathways through the pretectum to the hypothalamus in teleosts fish. *Brain Behav Evol* 36:14-29.
- Wullimann MF, Northcutt RG. 1990. Visual and electrosensory circuits of the diencephalon in mormyrids: an evolutionary perspective. *J Comp Neurol* 297:537-552.
- Wullimann MF, Meyer DL. 1993. Possible multiple evolution of indirect telencephalo-cerebellar pathways in teleosts: studies in *Carassius auratus* and *Pantodon buchholzi*. *Cell tissue Res* 274:447-455.
- Wullimann MF, Roth G. 1994. Descending telencephalic information reaches longitudinal torus and cerebellum via the dorsal preglomerular nucleus in the teleosts fish, *Pantodon buchholzi*: a case of neural preaptation. *Brain Behav Evol* 44:338-352.
- Wullimann MF, Hofmann MH, Meyer DL. 1991a. Histochemical, connectional and cytoarchitectonic evidence for a secondary reduction of the pretectum in the European eel, *Anguilla anguilla*. A case of parallel evolution. *Brain Behav Evol* 38:290-301.
- Wullimann MF, Meyer DL, Northcutt RG. 1991b. The visually related posterior pretectal nucleus in the non-percomorph teleosts *Osteoglossum bicirrhosum* projects to the hypothalamus: a DiI study. *J Comp Neurol* 312:415-435.
- Xu T, Wang C, Zhang R, Xu M, Liu B, Wei D, Wang G, Tian S. 2015. Carnosine markedly ameliorates H9N2 swine influenza virus-induced acute lung injury. *J Gen Virol*, doi: 10.1099/jgv.0.000238.

- Xue HG, Yamamoto N, Yang CY, Kerem G, Yoshimoto M, Imura K, Ito H. 2003. Fiber connections of the torus longitudinalis and optic tectum in holocentrid teleosts. *J Comp Neurol* 462:194-212.
- Yamamoto N, Ito H. 2005. Fiber connections of the anterior preglomerular nucleus in cyprinids with notes on telencephalic connections of the preglomerular complex. *J Comp Neurol* 24:212-233.
- Yamamoto N, Kato T, Okada Y, Somiya H. 2010. Somatosensory nucleus in the torus semicircularis of cyprinid teleosts. *J Comp Neurol* 518:2475-2502.
- Yang CY, Yoshimoto M, Xue HG, Yamamoto N, Imura K, Sawai N, Ishikawa Y, Ito H. 2004. Fiber connections of the lateral valvular nucleus in a percomorph teleost, tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J Comp Neurol* 474:209-226.
- Yáñez J, Anadón R. 1996. Afferent and efferent connections of the habenula in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). An indocarbocyanine Dye (DiI) study. *J Comp Neurol* 372:529-543.
- Yáñez J, Rodríguez M, Pérez S, Adrio F, Rodríguez-Moldes I, Manso MJ, Anadón R. 1997. The neuronal system of the saccus vasculosus of trout (*Salmo trutta fario* and *Oncorhynchus mykiss*): an immunocytochemical and nerve tracing study. *Cell Tissue Res* 288:497-507.
- Yáñez J, Pombal MA, Anadón R. 1999. Afferent and efferent connections of the parapineal organ in lampreys: a tract tracing and immunocytochemical study. *J Comp Neurol* 403:171-189.
- Yoshida M, Nagatsu I, Kawakami-Kondo Y, Karasawa N, Spatz M, Nagatsu T. 1983. Monoaminergic neurons in the brain of goldfish as observed by immunohistochemical techniques. *Experientia* 39:1171-1174.
- Yoshimoto M, Albert JS, Sawai N, Shimizu M, Yamamoto N, Ito H. 1998. Telencephalic ascending gustatory system in a cichlid fish, *Oreochromis* (Tilapia) *niloticus*. *J Comp Neurol* 392: 209-226.
- Zimmermann H, Altner H. 1970. Zur Charakterisierung neuronaler und gliöser

Elemente im Epithel des Saccus vasculosus von Konchenfischen. Z Zellforsch 3:106-126.

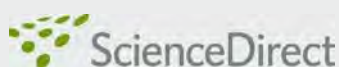
Zottoli SJ, Rhodes KJ, Corrodi JG, Mufson EJ. 1988. Putative cholinergic projections from the nucleus isthmi and the nucleus reticularis mesencephali to the optic tectum in the goldfish (*Carassius auratus*). J Comp Neurol 273:385-398.

Anexo I



VUGXO



available at www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/brainresBRAIN
RESEARCH

Research Report

Carnosine-like immunoreactivity in neurons of the brain of an advanced teleost, the gray mullet (*Chelon labrosus*, Risso)Iván Lamas^a, Ramón Anadón^b, Sofía Díaz-Regueira^{a,*}^aDepartment of Cell and Molecular Biology, Faculty of Sciences, University of A Coruña, 15007 A Coruña, Spain^bDepartment of Cell Biology and Ecology, University of Santiago de Compostela, 15706 Santiago de Compostela, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 14 February 2007

Available online 3 March 2007

Keywords:

Carnosine

HuC/D protein

Immunocytochemistry

Colocalization

Teleost

ABSTRACT

The distribution of the dipeptide carnosine (β -alanyl-L-histidine) and the related dipeptides anserine and homocarnosine has been studied by biochemical methods and immunohistochemistry in the brain of mammals and other tetrapods. These studies have indicated the presence of these dipeptides mainly in glial cells and in some neurons (olfactory receptor neurons and certain putative migrating neurons and neuroblasts). Here, we used immunohistochemistry with a polyclonal anti-carnosine antibody and the streptavidin-avidin method to study for the first time the distribution of carnosine/carnosine-related dipeptides in the brain of a teleost fish (the gray mullet *Chelon labrosus*). In order to assess the neuronal nature of carnosine-immunoreactive cells, we also used double immunofluorescence methods with antibodies to carnosine and to the neuronal protein HuC/D. The results obtained show that carnosine and/or related dipeptides are present in neurons of various brain regions. The carnosine-like-immunoreactive neuronal populations of the optic tectum and cerebellum are described in detail. In the optic tectum, immunoreactivity to carnosine/carnosine-related dipeptides is present in neurons of the stratum album and the stratum griseum centrale. In the cerebellum, immunoreactivity to

* Corresponding author. Fax: +34 981167065.

E-mail address: aifosdr@udc.es (S. Díaz-Regueira).

Abbreviations: AC, Anterior commissure; ATN, Anterior tuberal nucleus; CAR, Carnosine; CC, Cerebellar body; CG, Central gray; CN, Central nucleus of inferior hypothalamic lobes; Co, Cortical nucleus; Cr, Cerebellar crest; Dc, Central nucleus of the dorsal telencephalic area; Dd, Dorsal nucleus of the dorsal telencephalic area; Dld, Dorsal part of the lateral nucleus of the dorsal telencephalic area; Dlv, Ventral part of the lateral nucleus of the dorsal telencephalic area; Dm, Medial nucleus of the dorsal telencephalic area; DT, Dorsomedial thalamic nucleus; GL, Ganglionic layer; GR, Nucleus glomerulosus; GrL, Granular layer; H, Hypophysis; Ha, Habenula; HC, Horizontal commissure; IHL, Inferior hypothalamic lobe; IIL, Oculomotor nucleus; IXm, Glossopharyngeal motor nucleus; LC, Locus coeruleus; ML, Molecular layer; mlf, Medial longitudinal fascicle; MO, Medulla oblongata; mPO, Magnocellular preoptic nucleus; mV, Trigeminal motor nucleus; NI, Nucleus isthmi; NLV, Nucleus lateralis valvulae; NLT, Nucleus lateralis tuberis; Nmlf, Nucleus of the medial longitudinal fascicle; nV, Trigeminal nerve; OB, Olfactory bulb; OC, Optic chiasm; ON, Optic nerve; OT, Optic tectum; PA, Paracommissural nucleus; PC, Posterior commissure; PG, Preglomerular nucleus; pPO, Parvocellular preoptic nucleus; PSP, Parvocellular superficial pretectal nucleus; RF, Reticular formation; rl, Lateral hypothalamic recess; SAC, Stratum album centrale; SFGS, Stratum fibrosum et griseum superficiale; SGC, Stratum griseum centrale; SGN, Secondary gustatory nucleus; SM, Stratum marginale; SO, Stratum opticum; SP, Stratum periventriculare; sV, Trigeminal sensory nucleus; TE, Telencephalon; TL, Torus longitudinalis; TO, Optic tract; Vd, Dorsal nucleus of the ventral telencephalic area; Vlr, Abducens nucleus, rostral part; Vlc, Abducens nucleus, caudal part; VIImZ, Facial motor nucleus; VIIm, Magnocellular octaval nucleus; VIIIIt, Tangential octaval nucleus; VI, Lateral nucleus of the ventral telencephalic area; Vs, Supracommissural nucleus of the ventral telencephalic area; VT, Ventromedial thalamic nucleus; Vv, Ventral nucleus of the ventral telencephalic area; Xm, Vagal motor nucleus

these dipeptides is localized in Purkinje cells, in putative Golgi and stellate cells, and in many nerve fibers. Carnosine-like immunoreactive cells in mullet brain seem to be specific types of neurons, in line with previous results in a urodele but at variance with previous results in mammals, reptiles and anurans.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The dipeptide carnosine (β -alanyl-L-histidine) and the related dipeptides anserine (β -alanyl-N-methyl-L-histidine) and homocarnosine (γ -aminobutyryl-L-histidine), are present in muscle and nervous tissue of many vertebrates (Margolis, 1980). Early investigations based on biochemical analyses of the nervous system of vertebrates (amphibians, reptiles, birds and mammals) demonstrated that these dipeptides are present in the central nervous system, often associated with sensory systems like the olfactory system and/or the visual system (Margolis and Grillo, 1984; Artero et al., 1991a,b). Several approaches have revealed a complex pattern of cellular distribution of these peptides in the nervous system of mammals, involving both neuronal and glial cell types (Margolis, 1980). The glial cells containing carnosine/carnosine-related dipeptides are widely distributed throughout the whole brain and spinal cord, and include a subset of mature astrocytes and oligodendrocytes (Margolis, 1980). In neurons, the presence of these dipeptides is restricted to a particular type of neuron (the olfactory receptor neurons) and to certain populations of putative migrating neurons and neuroblasts (Margolis, 1980). Several studies have demonstrated that the carnosine/carnosine-related dipeptides are able to act in diverse but related protective roles, as antioxidants, metal chelators, free radical scavengers and inhibitors of protein glycosylation (De Marchis et al., 2000). Moreover, the detection of high levels of carnosine in the olfactory system of several species of mammal including humans, and its specific localization in olfactory receptor neurons, suggests that it has an important neuromodulatory role in neurotransmission (Margolis, 1974, 1978, 1980).

The cellular distribution of carnosine has not been investigated in the brain of fishes. The aim of the present work was to study for the first time the distribution of carnosine/carnosine-related dipeptides in the brain of a teleost fish, using immunohistochemistry. To this end, we used the gray mullet (*Chelon labrosus*; Order Perciformes), a species representative of advanced teleosts (Acanthopterygians) whose glia and some neuronal populations have been already studied in our laboratories (Gómez Segade and Anadón, 1986, 1988; Gómez Segade et al., 1989; Díaz Regueira and Anadón, 1989, 1995, 2000; Díaz-Regueira et al., 1992, 1993; Arochena et al., 2004). To our surprise, we found expression of carnosine in neuron-like cells distributed throughout all brain regions. We have characterized these cell populations, with special attention to those of the optic tectum and cerebellum because these layered structures are well studied in teleosts, allowing good characterization of immunoreactive cells. To do this, we used combined immunocytochemistry to carnosine and to HuC/D, RNA-binding proteins that are selectively expressed in neurons (Marusich et al., 1994; Kim et al., 1996; Okano and Darnell, 1997). Our results reveal for the first time

that carnosine and/or the related dipeptides homocarnosine and anserine are expressed in a number of neuronal populations in a fish brain, which is in marked contrast with the pattern of expression of these dipeptides in the brain of anurans and amniotes.

2. Results

2.1. Western blotting and specificity controls in sections

The antibody used here has already been shown to stain specifically carnosine and carnosine-like structures in mammals, birds, reptiles and amphibians. In order to rule out the possibility that in the mullet brain this antibody reacted nonspecifically with native proteins, we performed western blots of brain protein extracts, and immunostaining controls in which the primary antibody was preabsorbed with carnosine-BSA conjugates before incubation with the tissue section. In western blots, no protein band was stained (results not shown), indicating that the antibody only recognized carnosine/carnosine-like-protein conjugates formed during fixation. Moreover, preabsorption of the antibody with carnosine-BSA conjugate completely abolished immunostaining of brain sections (results not shown).

2.2. Carnosine immunoreactivity in the gray mullet brain is mainly found in neurons

Carnosine immunoreactivity was found in neurons throughout most brain regions (Fig. 1). In general, CAR immunoreactivity was more intense in perikarya, but there were also some CAR-ir fibers. Although the morphology and distributions of these cells clearly suggested they were neurons, this was checked by using double immunofluorescence to compare the distribution of carnosine and HuC/D immunoreactivities. Throughout the brain, all the putative CAR-ir neurons also showed immunoreactivity to HuC/D, as shown in selected examples in Figs. 2 and 3. However, the distribution of HuC/D immunoreactivity was more extensive than that of CAR-ir neurons, and a number of HuC/D-ir cells were not CAR-ir. The converse was also observed: in a few brain structures, including the subependymal region of the optic tectum, a few myelinated tracts and the optic nerve, putative small glial cells were CAR-ir, but with double fluorescence labeling these cells did not exhibit HuC/D immunoreactivity (Figs. 2A, D). In these tracts, a previous study in the mullet brain with the astroglial cell markers glial fibrillary acidic protein (GFAP) and vimentin (Arochena et al., 2004) has not demonstrated glial cells with similar morphology. This suggests that these putative cells are either filament-poor astrocytes or other types of glial cell (microglia, oligodendrocytes).

2.3. Distribution of carnosine-immunoreactive neurons in the mullet brain

The brain of the adult gray mullet contained a number of carnosine-like-immunoreactive (CAR-ir) neurons distributed throughout different regions of the telencephalon, diencephalon, mesencephalon and rhombencephalon (Fig. 1). In the telencephalon, the central region of the dorsal telencephalic area showed numerous medium-sized CAR-ir neurons (Figs. 1B-E and 4A). Smaller CAR-ir neurons were observed in the dorsal zone of the dorsal telencephalic area, and in several regions of the dorsal telencephalon, including the posterior and lateral regions where the CAR-ir cells are abundant (Figs. 1B-E and 4B). The dorsal nucleus of the ventral telencephalic area and the dorsal part of the ventral nucleus also show numerous small CAR-ir neurons (Figs. 1C-D and 4C). The magnocellular preoptic nucleus of mullet (see Gómez Segade and Anadón, 1986) also showed moderate CAR immunoreactivity in its large neurons, and abundant CAR-ir small neurons were found in the parvocellular part (Figs. 1E-F and 4D-E). Large neurosecretory neurons of the nucleus lateralis tuberis were also moderately CAR-ir (Fig. 1G). In the diencephalon, other conspicuous CAR-ir populations were observed in the cortex and medulla of the nucleus glomerulosus (Figs. 1I and 4F), in the preglomerular nuclear complex, in the central nucleus of the inferior hypothalamic lobes (Figs. 1J and 4G), and in some medial diencephalic nuclei including the dorsal portion of the habenula (Figs. 1F and 4H), the posterior tubercle, and the dorsomedial and ventromedial thalamus (Figs. 1H and 4H). In the pretectum, numerous CAR-ir neurons are found in the paracommissural region (Fig. 1G). Neurons of the nucleus of the medial longitudinal fascicle, and motoneurons in all brain stem motor nuclei (Figs. 1I-Q and 4I-K) (oculomotor, trochlear, trigeminal, abducens, facial, glossopharyngeal and vagal motor nuclei), showed moderate to intense CAR immunoreactivity. The torus semicircularis showed abundant CAR-ir neurons in central regions (Fig. 1I). In the isthmus, large cells of the locus coeruleus, small neurons of the central gray, and numerous small neurons of the secondary gustatory nucleus were CAR-ir (Fig. 1L). CAR immunoreactivity was observed in neurons of some primary sensory nuclei (principal sensory trigeminal nucleus, magnocellular and tangential octaval nuclei) (Figs. 1M, O). Numerous medium-sized or large reticular neurons of the brain stem showed CAR immunoreactivity (Figs. 1L, M). In addition, there were numerous CAR-ir neurons in the optic tectum and cerebellum, as well as in some closely related nuclei, which will be considered below in detail.

2.4. Optic tectum and related structures

The optic tectum of mullet contains numerous CAR-ir cells and nerve fibers. In the stratum periventriculare (SP) there were numerous small faint CAR-ir cells. In the gray mullet this layer is characteristically separated from the ventricular surface by a wide glial region (see Arochena et al., 2004). Judging from their location, these CAR-ir SP cells probably correspond to the type-XIV neurons described in the goldfish by Meek and Schellart (1978) (Figs. 2A-B and 5A-B). Also, small and medium-sized cells with oval or piriform perikarya loca-

ted in the stratum album centrale (SAC) showed moderate CAR immunoreactivity (Figs. 2A-B and 5A-B). These cells were fairly abundant. In addition, scattered small CAR-ir neurons were observed in the SAC, the stratum fibrosum et griseum superficiale (SFGS) and the stratum opticum (SO) (Figs. 2B and 5A). Colocalization studies with the HuC/D antibody in the optic tectum confirm the neuronal nature of these CAR-ir cells (Figs. 2A-B). In addition to these neuronal cells, there were some CAR-ir glial cells (HuC/D-negative) in the thick subventricular glial region of the mullet tectum located below the stratum periventriculare (Figs. 1H-I and 2A, D; see Arochena et al., 2004).

At the boundary between the rostral part of the optic tectum and the pretectum of the gray mullet, as in other advanced teleosts, there is a compact neuronal group that was named the cortical nucleus by Fritzsche (1878; see Gómez Segade and Anadón, 1988). The cortical nucleus of the mullet consists of medium-sized neurons with ovoid or piriform perikarya (Figs. 2C and 5E-F), which form a characteristic cell sheet that separates the pretectal area and the optic tectum in the region of entrance of the optic tract fascicles (Figs. 1F-G). The neurons of the cortical nucleus are intensely CAR- and HuC/D-immunoreactive. Fig. 2C shows the colocalization of carnosine and HuC/D immunoreactivities in the cortical nucleus. Previous studies with calretinin immunocytochemistry in developing mullet have demonstrated that the cortical nucleus does not form part of the pretectum, but rather is a tectal nucleus (Díaz-Regueira and Anadón, 2000).

The torus longitudinalis is a structure typical of actinopterygian fishes that is located below the midline of the optic tectum and is closely related to it. In the gray mullet, the torus longitudinalis presents numerous small granule-like cells distributed throughout most of the torus, and also larger neurons that are located mainly in the dorsomedial region near the fiber bundles relating this structure with the optic tectum. These larger cells were rather intensely CAR-immunoreactive, containing numerous immunoreactive puncta, whereas small cells showed much paler staining (Figs. 5G-H). These CAR-ir cells again showed colocalization with HuC/D immunoreactivity (Fig. 3A). In addition, the torus longitudinalis contained a number of CAR-ir processes (Figs. 1I-J and 5H).

The nucleus isthmi of teleosts is functionally closely related to the optic tectum and located in the isthmus near the anterior medullary velum (Fig. 1J). In the gray mullet, it consists of a crown of pyramidal or polygonal cells arranged around a wide central neuropil. The neurons of the crown showed rather high CAR immunoreactivity, whereas the central neuropil showed only scarce immunoreactive processes (Fig. 5I).

2.5. Cerebellum and cerebellum-related structures

As in other teleosts, the cerebellum of the gray mullet consists of the corpus cerebelli, the cerebellar valvula and the granular eminences. These parts contain some CAR-ir neurons (Figs. 1J-O). In the corpus cerebelli, the most prominent CAR-ir population is localized in the ganglionic layer, which extends between the molecular layer (external) and the granular layer (inner). In the cerebellar valvula the relative position of these three layers is apparently inverted due to the invagination of

the valvular leaflet and meninges toward the midbrain ventricle during development, so the granular layer is located in the external (periventricular) position and the molecular layer is located in the inner position (toward the interleaf meninges).

The CAR-ir cells of the ganglionic layer of the cerebellar valvula are mainly situated in the ventral region, whereas in the corpus cerebelli they are found in dorsal, lateral and ventral regions close to the molecular layer. These cells are piriform somata that are contacted by CAR-ir synaptic boutons (Figs.

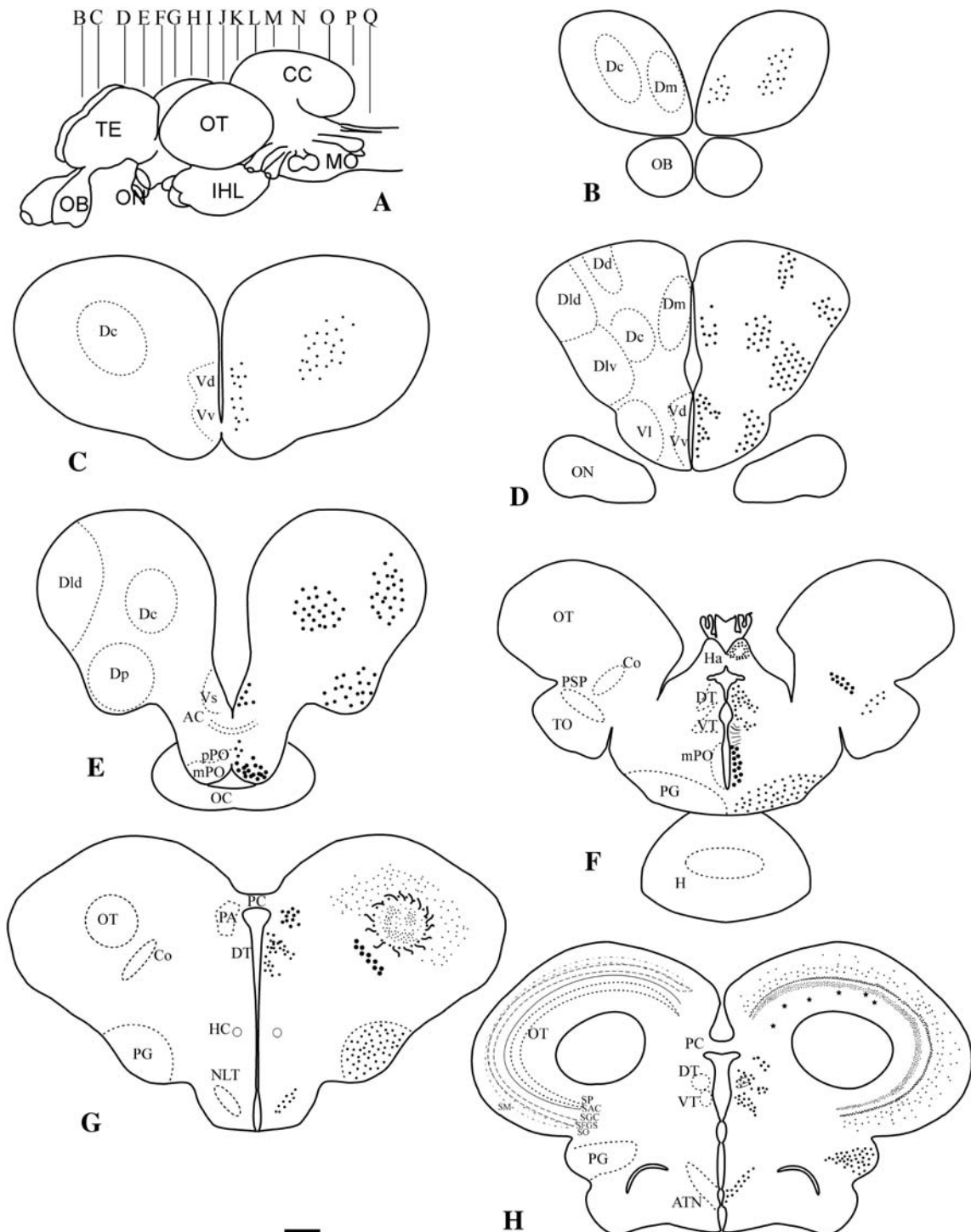


Fig. 1 – Schematic drawings of transverse sections through the brain showing the distribution of carnosine-immunoreactive (CAR-ir) neurons (black dots at right of the sections), fibers (dashes at right of the sections) and glial cells (stars at right of the sections). Large dots represent large neurons, small dots small or medium-sized cells (for explanation of the different nuclei and other topographical landmarks, see list of abbreviations). The approximate position of the sections is indicated by vertical lines on the lateral view of the brain. Scale bars: 200 μ m (B-Q), 600 μ m (A).

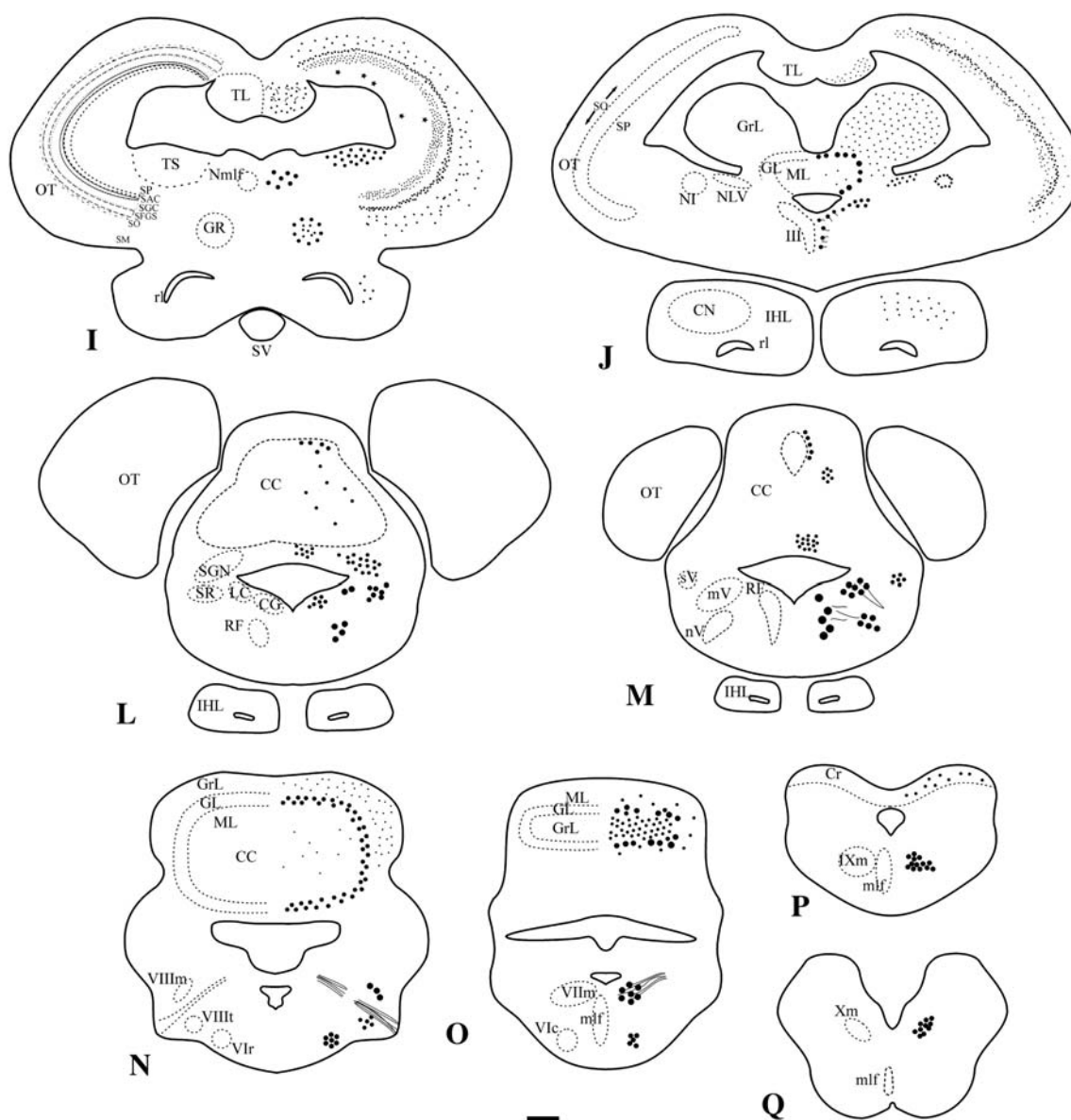


Fig. 1 (continued).

5J-K). They were also HuC/D-immunoreactive (Fig. 3C), which confirms their neuronal nature. Whether these neurons were Purkinje cells or eurydendroid cells (another cell type of the ganglionic layer) could not be assessed because morphological distinction between these cell types is mainly based on the characteristics of the dendritic tree and the presence of spine-rich dendrites, whereas in this case the dendrites were carnosine-negative. However, comparison of the distribution of these cells with those in parallel sections immunostained for calretinin and parvalbumin, which label eurydendroid cells and Purkinje cells respectively (unpublished results), indicates that the large CAR-ir cells of the ganglionic layer are Purkinje cells.

In the granular layer of the three cerebellar regions, there were scattered medium-sized neurons with rounded somata and small size that showed both carnosine and HuC/D immunoreactivities (Figs. 3B and 5L); these cells were inter-

preted as putative Golgi cells. The granule cells were CAR-negative. In addition, moderate CAR immunoreactivity was observed in beaded nerve fibers that appear to correspond to mossy fiber enlargements in cerebellar glomeruli (Fig. 5K). These fibers are located among cords of granule cells. The molecular layer contains scarce small cells immunoreactive for both carnosine and HuC/D, that may correspond to stellate cells (Fig. 3C).

The cerebellar valvula of mullet is joined to the midbrain tegmentum through a characteristic small-celled nucleus, the lateral nucleus of the valvula, which is one of the principal precerebellar nuclei of teleosts. The cells of this nucleus showed faint to moderate CAR immunoreactivity (Fig. 1J). These cells might be responsible for the CAR immunoreactivity observed in mossy fibers throughout the cerebellum.

The medial nucleus of the octavolateral area of the rhombencephalon of mullet, as in other teleosts, is covered

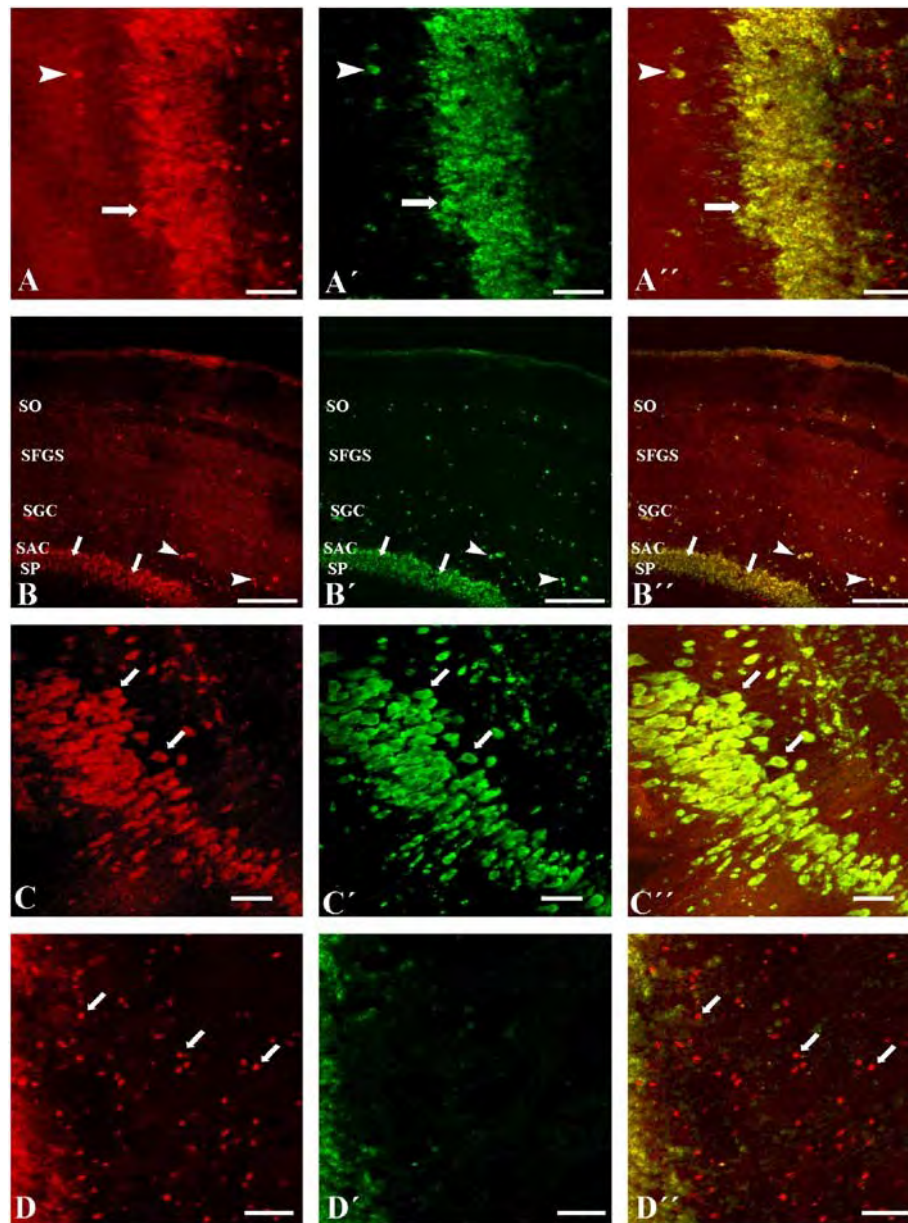


Fig. 2 – Confocal photomicrographs of transverse sections showing carnosine (red; left column) and HuC/D (green; central column) immunofluorescence, and overlay (right column) with colocalization of these substances in neurons (in yellow). (A and B) Optic tectum showing carnosine and HuC/D colocalization in neurons of the stratum periventriculare (arrows) and the stratum griseum centrale (arrowheads). (C) Cortical nucleus showing large neurons expressing both carnosine and HuC/D (white arrows). D, Subventricular region of the optic tectum showing CAR-ir glial cells (arrows) below the stratum periventriculare. For abbreviations, see List. Scale bars: 50 μ m (A, C, D), 150 μ m (B).

by a molecular layer, the cerebellar crest, that is continuous with the molecular layer of the cerebellum (see [Díaz Regueira and Anadón, 1989, 1995](#)). In the medial nucleus proper there is a population of CAR-ir neurons with spindle-shaped perikarya that send pale CAR-ir dendrites to the cerebellar crest. These cells correspond to "crest cells", the efferent neurons of this octavolateral region ([Fig. 1P](#)).

Finally, the gray mullet shows a large precerebellar nucleus in the ventromedial region of the caudal rhombencephalon, the inferior olive, that consists of numerous calretinin-ir cells

([Díaz-Regueira and Anadón, 2000](#)). The inferior olive did not show CAR-ir neurons, which appears to be in accordance with the absence of CAR-ir climbing fibers in the molecular layer of the cerebellum.

3. Discussion

The results of this immunohistochemical study (using both streptavidin-biotin and immunofluorescence methods)

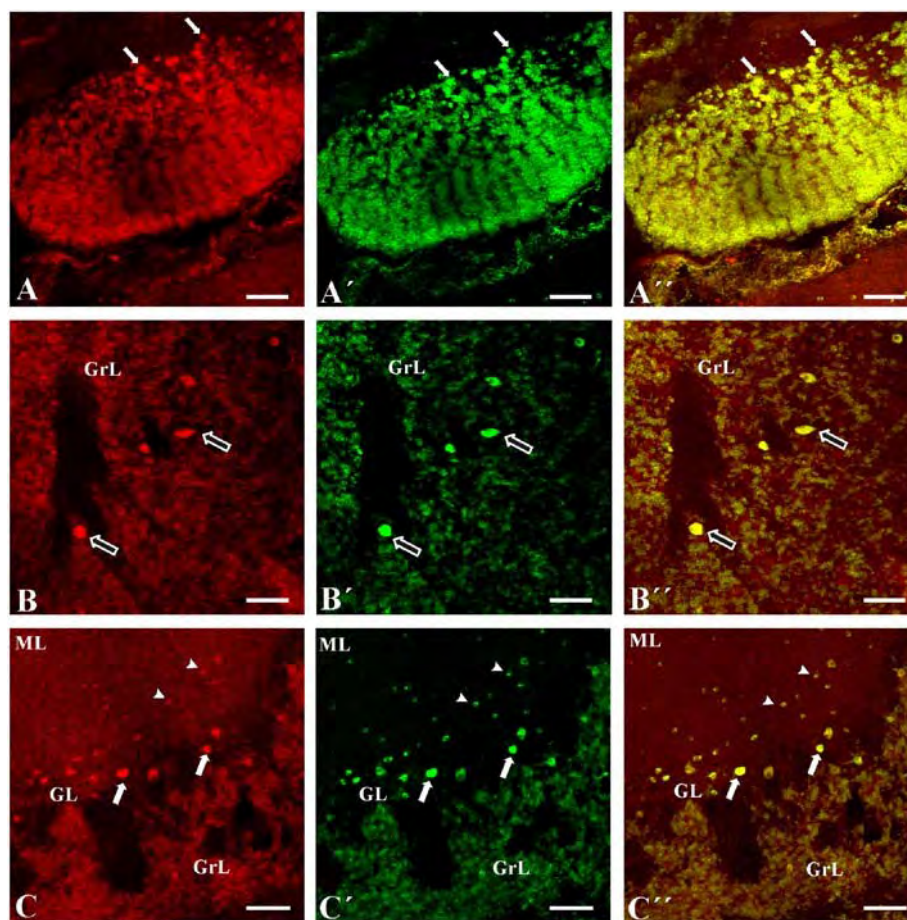


Fig. 3 – Confocal photomicrographs of transverse sections showing carnosine (red; left column) and HuC/D (green; central column) immunofluorescence, and overlay (right column) with colocalization of these substances in neurons (in yellow). (A) Colocalization of carnosine and HuC/D immunoreactivities in neurons (white arrows) of the torus longitudinalis. (B and C) Colocalization of carnosine and HuC/D immunoreactivities in neurons of the corpus cerebelli. Arrowheads, cells in the molecular layer (ML); White arrows, Purkinje cells in the ganglionic layer (GL); Open arrows (in B), Golgi cells in the granular layer (GrL). Scale bars: 50 μ m.

demonstrate the presence of immunoreactivity to carnosine and/or related dipeptides in specific neuronal populations of the gray mullet brain, studied in detail in the optic tectum and cerebellum.

3.1. Specificity of the anti-carnosine antiserum

The polyclonal anti-carnosine antiserum used in this work has been well characterized in previous studies (Biffo et al., 1990; Artero et al., 1991a,b). This antiserum is raised in rabbit against carnosine conjugated to various carrier proteins (excluding BSA), and also cross-reacts with homocarnosine (Biffo et al., 1990). After preincubation of the primary antiserum with a carnosine-BSA conjugate the immunoreactivity to carnosine in the mullet brain was completely abolished. Moreover, western blotting results indicate that this antibody does not cross-react with native proteins in the mullet brain. We can therefore conclude that the immunoreactivity detected in this study with this antibody corresponds to the presence of carnosine and/or carnosine-related dipeptides like homocarnosine or anserine.

3.2. Carnosine-like immunoreactivity is present in specific neurons throughout the brain in the gray mullet

A major result of the present study is that in the gray mullet brain carnosine was mainly localized in neuronal populations, as indicated by studies of the expression of HuC/D, an RNA-binding protein that in the central nervous system of various vertebrates is expressed early in neurons (Kim et al., 1996; Okano and Darnell, 1997; Wakamatsu and Weston, 1997; Park et al., 2000; Satoh et al., 2001; Sueiro et al., 2004). Our results in gray mullet indicate that HuC/D is also expressed specifically in cells with neuronal appearance throughout the adult brain, and not in glial populations, in agreement with recent results on HuC/D expression in embryonic and adult fishes (Park et al., 2000; Mueller and Wullmann, 2002; Sueiro et al., 2004). Double immunofluorescence methods confirm that CAR-ir cells also show HuC/D immunoreactivity, indicating that in the gray mullet carnosine is found in neurons. Interestingly, this result is at variance with results in the brain of mammals indicating that carnosine is primarily found in glial cells, namely ependymocytes, tanyocytes, astrocytes and oligodendrocytes

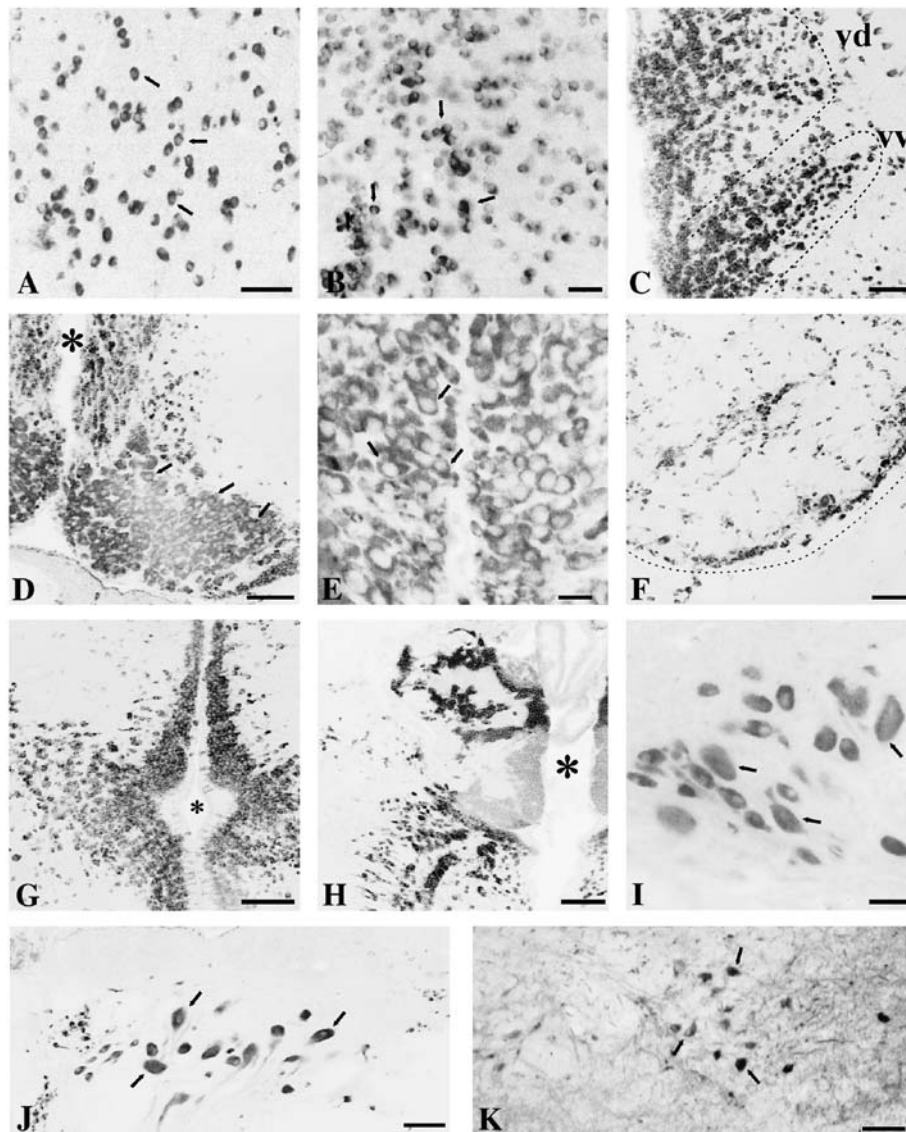


Fig. 4 – Confocal (A–J) and light field (K) photomicrographs of transverse sections of various brain regions showing CAR-ir neurons. (A) Central region of the dorsal telencephalic area showing CAR-ir neurons. (B) Lateral region of the dorsal telencephalic area showing small CAR-ir neurons (arrows). (C) Ventral telencephalic area showing small CAR-ir neurons in the dorsal (Vd) and ventral nucleus (Vv). (D) Preoptic region showing large CAR-ir neurons in the magnocellular preoptic nucleus (arrows). Asterisk, preoptic recess. (E) Detail of magnocellular preoptic neurons (arrows). (F) Portion of the nucleus glomerulosus showing large and small CAR-ir neurons in the rim and the core, respectively. (G) Medial hypothalamus showing numerous small CAR-ir cells in a close to the infundibular recess (asterisk) and extending laterally in the nucleus of the lateral recess. (H) Habenula showing irregular cords of small, intensely CAR-ir neurons in intermediate regions of the habenula, and very faint cells in the ventral region. Note also the rows of CAR-ir cells of the thalamus below the habenula. Asterisk, third ventricle. (I–K) CAR-ir neurons in the trigeminal (I), oculomotor (J) and abducens (K) motor nuclei. Confocal photomicrographs were converted to gray scale, inverted and printed as positives. Scale bars: 50 µm (A, C, F, J, K), 20 µm (B, E, I), 100 µm (D, G, H).

(Biffo et al., 1990; Jackson and Lenney, 1996; De Marchis et al., 1997; Peretto et al., 1998; Bonfanti et al., 1999). In brains of other tetrapods, carnosine immunoreactivity has been found mainly in glia (anurans and lizards; Artero et al., 1991a). However, in a urodele (the crested newt *Triturus cristatus*), carnosine immunoreactivity was observed in neurons of several brain regions, but not in glia (Artero et al., 1991b). In some brain regions the distribution of CAR-ir neurons of newt is rather similar to that observed in mullet. Specifically, about 80% of neurons of the

newt medial pallium were CAR-ir, and several cells were present in dorsal and lateral pallia. Likewise, the dorsal telencephalic area (pallium) of mullet contains a number of CAR-ir neurons in several regions, including the lateral region that is thought to be the teleost medial pallium homologue (see Broglio et al., 2005). In the newt subpallium, the striatum showed abundant CAR-ir cells, and CAR immunoreactivity is also found in cells of the septum (Artero et al., 1991a,b), whereas in the mullet abundant CAR-ir cells are found in

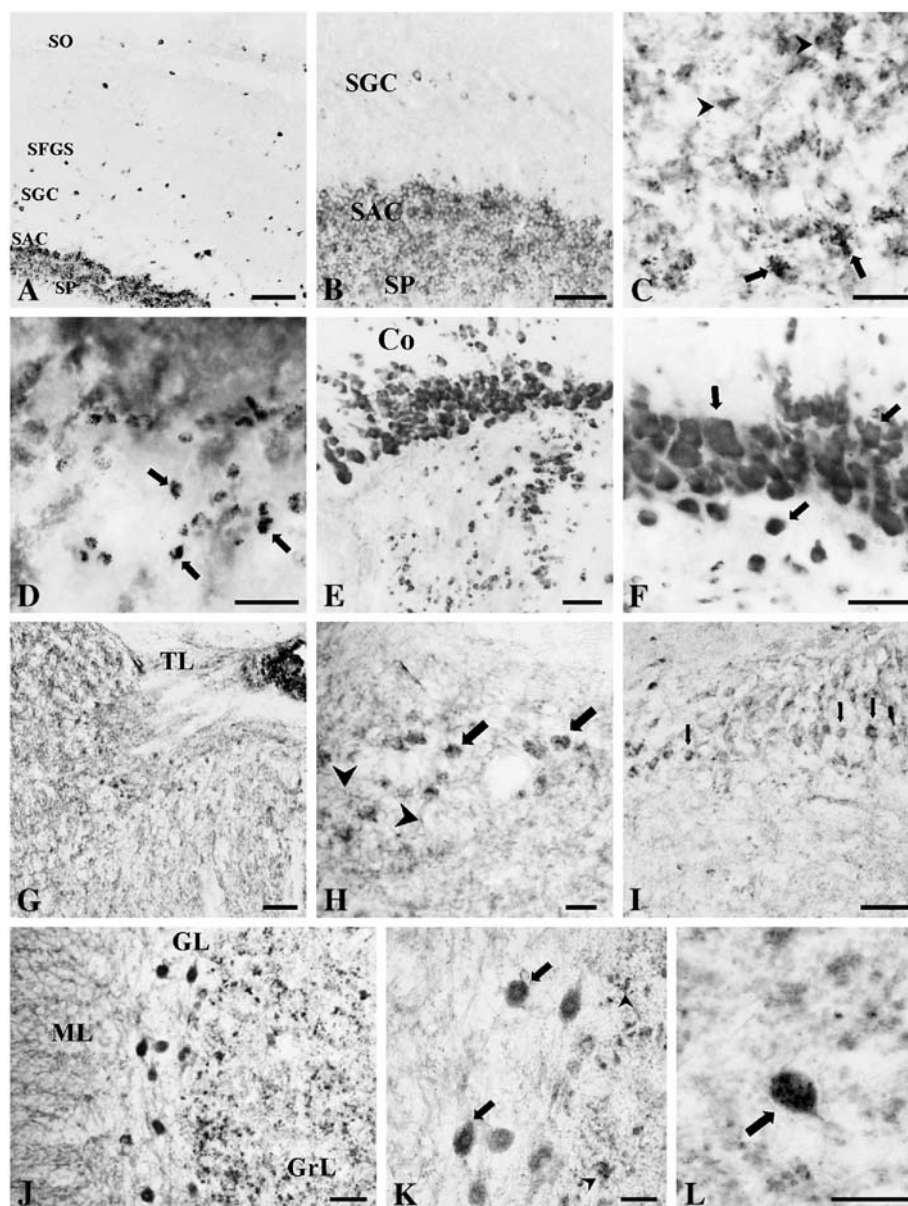


Fig. 5 – Confocal (A, B, D–F) and light field (C, G–L) photomicrographs of transverse sections of various brain regions showing CAR-ir neurons. (A–C) Optic tectum showing CAR-ir neurons (A, B) and fibers (C). SO, Stratum opticum; SFGS, Stratum fibrosum et griseum superficiale; SAC, Stratum album centrale; SGC, Stratum griseum centrale; SP, Stratum periventriculare. (D) Subventricular region of the optic tectum showing CAR-ir glial cells (arrows). (E) Cortical nucleus showing large CAR-ir neurons. (F) Detail of the CAR-ir cells (arrows) of the cortical nucleus. (G) Torus longitudinalis showing CAR-immunoreactivity. (H) Detail of the torus longitudinalis showing CAR-ir neurons (arrows) and cell processes (arrowheads). (I) Detail of the nucleus isthmi showing CAR-ir cells (arrows) of the cell rim surrounding the central neuropil (bottom). (J) Corpus cerebelli showing CAR-ir Purkinje cells in the ganglionic layer (GL). ML, Molecular layer; GrL, Granular layer. (K) Detail of J showing CAR-ir Purkinje cells (arrows) and mossy-like fibers (arrowheads). (L) Detail of the granular layer showing a putative CAR-ir Golgi cell (arrow). Confocal photomicrographs were converted to gray scale, inverted and printed as positives. Scale bars: 75 µm (A, E, G, J), 50 µm (B, F, I), 30 µm (C, D, H, K), 5 µm (L).

several nuclei of the ventral telencephalic area (the subpallium homologue). By comparison, CAR-ir cells appear very numerous in the mullet preoptic nucleus, in both the magnocellular and parvocellular parts, whereas relatively few cells are found in this nucleus in the newt (Artero et al., 1991a,b). The neurosecretory nucleus lateralis tuberis, which shows large

CAR-ir cells in mullet, is a specific nucleus of teleosts not present in amphibians. The medial regions of the thalamus have CAR-ir neurons in both newt (Artero et al., 1991a,b) and mullet. The highly differentiated hypothalamus/posterior tubercle of mullet exhibits several nuclei with numerous CAR-ir neurons, whereas the newt hypothalamus shows

scarce CAR-ir cells. Moreover, in the optic tectum of mullet CAR-ir neurons appear far more numerous than in newt, in which less than 10% neurons were CAR-ir (Artero et al., 1991a, b). Differences between newt and mullet are also significant in the cerebellum: only some Purkinje cells were CAR-ir in the newt cerebellum (Artero et al., 1991a,b), whereas in the mullet some Purkinje cells, putative Golgi cells and a subset of stellate-like cells were CAR-ir. Also, the motor nuclei, and cells of some primary sensory nuclei and several nuclei of the isthmus, were CAR-ir in mullet, whereas homologous nuclei are not mentioned as containing CAR-ir cells in newt (Artero et al., 1991a,b). These results indicate that in mullet the CAR-ir neuronal system is much more extensive than in the crested newt.

Although in the present report we focus on the results obtained in the optic tectum and cerebellum, because cell populations of these structures are well characterized in teleosts, carnosine immunoreactivity is found in neurons distributed throughout the whole brain. This would suggest that the functions of carnosine-related dipeptides in the brains of the gray mullet and crested newt are different from those in the brains of other tetrapods.

Since the gray mullet is the first fish species studied for carnosine immunoreactivity, it is not possible to generalize the distribution observed to other fishes. However, similar discrepancies in cell location between teleosts and mammals have been reported for other substances. In teleost brains, aromatase expression is found in glial cells (Forlano et al., 2001; Menuet et al., 2003), whereas in mammal brains this enzyme is found in neurons under basal conditions (see García-Ovejero et al., 2005), and is upregulated in glial cells after injury (Saldaña et al., 2000; Veney and Rissman, 2000). Similar discrepancies have also been noted for NADPH-diaphorase activity in the brain, which in some teleosts shows both glial and neuronal distribution (Arévalo et al., 1995; Pérez et al., 1996; Manso et al., 1997; Ota et al., 1999), versus neuronal only in tetrapods (Scherer-Singler et al., 1983; Leigh et al., 1990; Hope et al., 1991; López and González, 2002). This suggests that, like other systems, carnosine-expressing systems have undergone important changes during phylogeny.

3.2.1. Optic tectum

The optic tectum is the main visual and visuomotor center in teleosts, but also receives fibers from a variety of brain regions (reviewed in Meek and Nieuwenhuys, 1998). The presence of CAR-ir neurons in several layers of the optic tectum suggests that they are involved in several aspects of visual function. The CAR-ir cells similar to Meek's type-XII cells that are located in the superficial part of the SAC might receive visual input (Meek, 1981; Niida et al., 1989). Meek's type-XII cells project axons to the torus semicircularis (Grover and Sharma, 1981; Ito et al., 1986) and also to the rhombencephalon (Niida et al., 1989). CAR-ir cells observed in the SO extend dendrites in three sublayers of the SGC. These CAR-ir cells are similar to Meek's type-XIII neurons, whose perikarya are located in the SAC, send dendrites to more superficial layers and may project to extratectal centers such as the superficial parvocellular pretectal nuclei (Murakami et al., 1986).

The torus longitudinalis (TL) is a structure exclusive to actinopterygian fishes that is closely related with the optic

tectum. Its neurons project thin (parallel) fibers to the most superficial layer of the tectum, the stratum marginale, whereas tectal cells located in the SGC project to the TL (Ito and Kishida, 1978; Wullimann, 1994; Wullimann and Roth, 1994; Ito et al., 2003; Xue et al., 2003). The presence of numerous CAR-ir fibers as well as some CAR-ir cells in the gray mullet SGC suggests that these CAR-ir cells are toro-tectal projecting neurons. The contribution of carnosine/carnosine-related dipeptides to possible roles in these toro-tectal cells is unknown. The torus longitudinalis also receives afferents from the region of the oculomotor nucleus (Northmore et al., 1983; Northmore, 1984; Ito et al., 2003; Xue et al., 2003), and may be implicated in integration of the function of the visual and lateral line systems, coordinating eye and body movements (Guthrie, 1990; Meek, 1992). Comparative studies have demonstrated that toro-tectal projections are well developed in teleosts that live in turbulent waters or that swim actively from superficial zones to deeper zones (Kishida, 1979).

The cortical nucleus of Fritzsche (1878) is a very conspicuous structure located below the rostral tectum in some advanced teleosts, including mullets (Gómez Segade and Anadón, 1988; Sakamoto and Ito, 1982; Butler et al., 1991; present results). This nucleus is crossed by optic fibers originating from the retina (Ebbesson and Ito, 1980), and in advanced teleosts it appears to send fibers to the corpus glomerulosum (nucleus rotundus of Fritzsche, 1878), a conspicuous diencephalic nucleus present in these teleosts (Sakamoto and Ito, 1982). The cortical nucleus of mullet can be easily characterized by its intense CAR immunoreactivity, but possible functions of this nucleus and the roles of carnosine-related dipeptides in these cells remain speculative.

3.2.2. Cerebellum

The teleost cerebellum, like that of amniotes, has three gray matter layers: the molecular, ganglionar and granular layers. [The Purkinje cell layer in actinopterygian fishes used to be called the ganglionar layer because large neurons of another type, eurydendroid cells, are found in or below this layer.] We observed CAR-ir cells in the ganglionar layer, and it is probable that both these neuronal types contain carnosine. The corpus cerebelli projects from peripheral eurydendroid cells to the ventromedial and ventrolateral thalamic regions, the ventral accessory optic nucleus, the oculomotor nerve nucleus, the mesencephalic reticular formation, the longitudinal medial fascicle nucleus, the dorsalmost region of the inferior hypothalamic lobe, and the superior and inferior reticular formation (Wullimann and Northcutt, 1988).

Optic tectum and cerebellar CAR-ir cells show relationships with numerous neuronal populations belonging to the main brain subdivisions involved in specific circuits: so the results of the present study are consistent with the suggested function of carnosine as a neuromodulator or neurotransmitter.

3.3. Functional considerations

Carnosine and related dipeptides are normal constituents of muscle and nervous tissues, but their physiological functions remain obscure (see Bauer, 2005). Several studies of the functions of carnosine-related dipeptides in mammals have demonstrated that these substances are able to act in different

but related protective roles (De Marchis et al., 2000). Carnosine-related dipeptides have also been shown to protect against the toxic effects of a truncated form of the neurotoxic beta-amyloid peptide (implicated in cerebral vascular dysfunction and Alzheimer's disease) in cultured rat brain vascular endothelial cells (Preston et al., 1998). Another example of the protective role of carnosine is the previous finding that this dipeptide protects rat cerebellar granular cells from free radical damage *in vitro* (De Marchis et al., 2000). Whether carnosine and related peptides have similar roles *in vivo* is not known.

Our results in mullet brain reveal a marked difference in the cellular distribution of carnosine with respect to the brain of mammals, which might indicate that the physiological functions of carnosine/carnosine-related peptides in fishes are different from those in mammals. Notably, many neurons of the mullet brain appear to contain considerable amounts of carnosine, judging from the intensity of carnosine immunostaining. Although the presence of carnosine in mammalian olfactory neurons has led to suggestions of a neurotransmitter/neuroregulatory function (Margolis, 1974, 1978), such a function has not been confirmed experimentally (for review, see Bonfanti et al., 1999). Although in mullet brain CAR immunoreactivity is also observed in some neuropil regions and in some fibers, the highest concentration is seen in perikarya, which is in contrast with the distribution of most neurotransmitters. Moreover, it remains to be elucidated whether mullet neurons synthesize carnosine, or take it up from the extracellular space. Although mammalian olfactory cells contain large amounts of carnosine, the peptide appears to be synthesized by ensheathing glial cells of the olfactory nerves (Bakardjiev and Bauer, 2000). Whether carnosine/carnosine-related peptides in teleost neurons are involved in neuroprotective, neuromodulatory and/or metabolic functions remains to be elucidated.

4. Experimental procedures

4.1. Study animals and tissue preparation

Adult specimens of gray mullet (10–25 cm in length) were caught in the Ría da Coruña (northwest Spain) and maintained in well-aerated aquariums. Before fixation, all specimens were deeply anesthetized by immersion in 0.05% tricaine methane sulfonate (Sigma, St. Louis, MO) in sea water. All procedures conformed to the European Community's guidelines on animal care and experimentation. After anesthesia, mullets were perfused transcardially with cold 0.1 M phosphate buffer (PB) containing 4% paraformaldehyde (pH 7.4). Brains were carefully dissected out and postfixed in the same fixative for 24 h at 4 °C. The tissues were subsequently rinsed in PB, cryoprotected in increasing sucrose solutions in PB (10%, 20% and 30%) pH 7.4 at 4 °C for 24 h, and then frozen in liquid-nitrogen-cooled 2-methylbutane and sectioned on a cryostat at 12 µm thick. Cryostat sections were mounted on gelatin-coated slides.

4.2. Antibodies

The anti-carnosine rabbit polyclonal antiserum was a generous gift from Dr. F.L. Margolis. This anti-carnosine serum was

preabsorbed with BSA-glycine and BSA-histidine conjugates to increase the specificity of the reaction. The monoclonal antibody to the neuronal antigen HuC/D was obtained from Molecular Probes (Eugene, OR).

4.3. Immunohistochemistry

4.3.1. Carnosine immunohistochemistry

After washes in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7.4, sections were treated with 3% H₂O₂ in PBS to inactivate endogenous peroxidase. They were incubated with 1:100 normal goat serum (Dakopatts, Barcelona, Spain) diluted in PBS for 60 min to reduce nonspecific background and then incubated overnight with polyclonal rabbit anti-carnosine antiserum (Dr. Margolis) diluted 1:400 in PBS containing 1% Triton X-100. After rinsing in PBS, the sections were incubated with 1:500 biotinylated goat anti-rabbit (Dakopatts) diluted in PBS for 1 h, followed by streptavidin-biotin ABC-complex (ABC-complex; Dakopatts) diluted in Tris-HCl for 1 h. The sections were then rinsed in PBS and revealed for 10 min in 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.6) containing 0.05% diaminobenzidine (DAB, Sigma) and 0.03% H₂O₂.

4.3.2. Double immunofluorescence labeling for carnosine and HuC/D

In order to characterize the neuronal cells labeled by the anti-carnosine antibody, double immunofluorescence was performed by incubating sections with a mixture of primary antisera to carnosine (dilution 1:400) and to the neuronal antigen HuC/D (Molecular Probes; dilution 1:500), diluted in PBS containing 1% Triton X-100. After washes in PBS the sections were incubated with a mix of fluorescein-coupled goat anti-mouse (Sigma; dilution 1:50) and Texas-red-coupled goat anti-rabbit (Sigma; dilution 1:50) in PBS for 2 h in the darkness, washed in PBS and mounted with Vectashield (Vector, Burlingame, CA). All experiments were carried out at room temperature.

4.3.3. Controls and specificity

The anti-carnosine antiserum from Dr. Margolis gave reliable and reproducible immunolabeling patterns in all specimens studied. Immunohistochemical controls for carnosine included incubation of sections in carnosine antiserum preincubated with BSA-carnosine conjugate or without the primary antibodies. No staining of tissue was observed in these cases. Since the anti-carnosine antibody also reacts with homocarnosine-BSA and anserine-BSA conjugates (Margolis, 1980), the immunostaining was referred to as carnosine-like (CAR-ir). Further control of specificity of the anti-carnosine antiserum in the mullet brain included Western blotting (Section 4.4).

The HuC/D monoclonal antibody used here is a general neuronal marker in developing and adult teleosts (zebrafish: Bernardos and Raymond, 2006; Grandel et al., 2006) and elasmobranchs (dogfish: Sueiro et al., 2004). Specifically, Grandel et al. (2006) found no colocalization of HuC/D with the glia-specific marker S100β in the zebrafish brain. Comparison of our present HuC/D immunostaining results with results obtained with the glial cell markers vimentin and glial fibrillary acidic protein in mullet (Arochena et al., 2004) indicates that the HuC/D monoclonal antibody used is also specific for neurons in this teleost. Omission of the primary antibody from the

immunostaining procedure led to no staining of any structure. Since the antibody was only intended as a neuronal marker, no further controls were performed.

4.4. Western blotting

In order to test whether the anti-carnosine antibody reacts with native brain proteins in fish, Western blots were performed on protein extracts of brains of three adult mullets obtained by decapitation under deep anesthesia. Brains were mechanically homogenized in a cold buffer solution containing 50 mM Tris (Sigma), 5 mM EDTA (Sigma), 150 mM NaCl, and protease inhibitors (2 mM of 2-mercaptoethanol, leupeptin, aprotinin, pepstatin and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), from Sigma), pH 7.6. After centrifugation, aliquots containing 40 µg protein from the supernatant (determined by Bradford's method; Bradford, 1976) were separated by SDS-polyacrylamide gel (17% acrylamide) electrophoresis. Gels were stained with Coomassie blue and electroblotted onto nitrocellulose paper. Non-specific binding was blocked by incubation with 5% no-fat milk powder in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) containing 0.2 Tween-20. Blots were incubated for 24 h at room temperature with polyclonal anti-carnosine (gift by F.L. Margolis; dilution 1:400) antisera, both in PBS with 0.2 Tween and 5% no-fat milk powder, and stained following a schedule similar to that used for immunohistochemistry. No immunostained protein band was observed in these controls (not shown).

4.5. Microscopy and imaging

The slides were examined with a Eclipse E1000 epifluorescence photomicroscope (Nikon, Tokyo, Japan) equipped with the appropriate filter combination (fluorescein, rhodamine) and/or a Leica TCS-SP2 spectral laser confocal microscope (Leica, ra DXM 1200 (Nikon, Tokyo, Japan) coupled to the photomicroscope. Confocal images are projections of six 1-µm-thick optical sections recorded on the TCS-SP2 microscope. The contrast and brightness of the digital images were adjusted with Photoshop (Adobe, San Jose, CA). Final plates were composed and labeled with Corel Draw 12 (Corel, Ottawa, Canada).

Acknowledgments

We thank Dr. F.L. Margolis for his advice during preparation of the manuscript and the generous gift of the anti-carnosine serum and the carnosine-BSA conjugate. This work was supported by a grant (BFU2004-03144/BFI) from the Spanish Ministry of Education and Science.

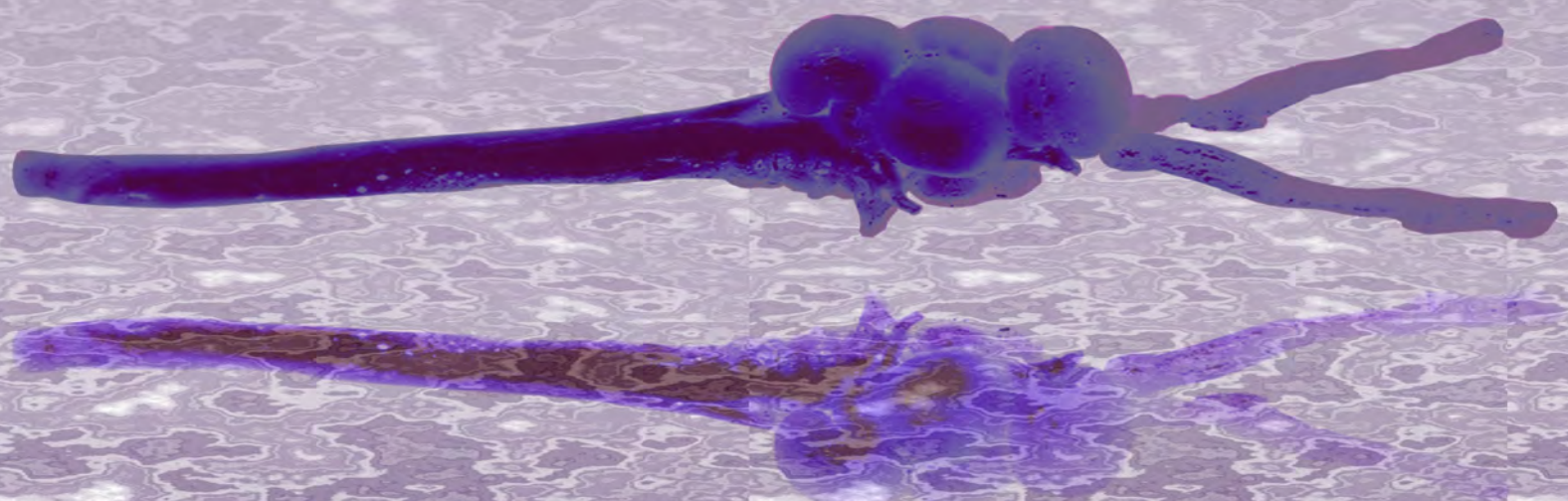
REFERENCES

- Arévalo, R., Alonso, J.R., García-Ojeda, E., Briñón, J.G., Crespo, C., Aijón, J., 1995. NADPH-diaphorase in the central nervous system of the tench (*Tinca tinca* L., 1758). *J. Comp. Neurol.* 352, 398-420.
- Arochena, M., Anadón, R., Díaz-Regueira, S.M., 2004. Development of vimentin and glial fibrillary acidic protein immunoreactivities in the brain of gray mullet (*Chelon labrosus*), an advanced teleost. *J. Comp. Neurol.* 469, 413-436.
- Artero, C., Marti, E., Biffo, S., Mulatero, B., Andreone, C., Margolis, F.L., Fasolo, A., 1991a. Carnosine in the brain and olfactory system of amphibia and reptilia: a comparative study immunocytochemical and biochemical methods. *Neurosci. Lett.* 2, 182-186.
- Artero, C., Mulatero, B., Biffo, S., Gozzo, S., Margolis, F.L., Fasolo, A., 1991b. Distribution of carnosine-like immunoreactivity in the brain of the crested newt. *Brain Behav. Evol.* 37, 168-178.
- Bakardjiev, A., Bauer, K., 2000. Biosynthesis, release, and uptake of carnosine in primary cultures. *Biochemistry (Moscow)* 65, 779-782.
- Bauer, K., 2005. Carnosine and homocarnosine, the forgotten, enigmatic peptides of the brain. *Neurochem. Res.* 30, 1339-1345.
- Bernardos, R.L., Raymond, P.A., 2006. GFAP transgenic zebrafish. *Gene Expr. Patterns* 6, 1007-1013.
- Biffo, S., Grillo, M., Margolis, F.L., 1990. Cellular localization of carnosine-like and anserine-like immunoreactivities in rodent and avian central nervous system. *Neuroscience* 35, 637-651.
- Bonfanti, L., Peretto, P., De Marchis, S., Fasolo, A., 1999. Carnosine-related dipeptides in the mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* 59, 333-353.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Broglio, C., Gómez, A., Durán, E., Ocaña, F.M., Jiménez-Moya, F., Rodríguez, F., Salas, C., 2005. Hallmarks of a common forebrain vertebrate plan: specialized pallial areas for spatial, temporal and emotional memory in actinopterygian fish. *Brain Res. Bull.* 66, 277-281.
- Butler, A.B., Wullimann, M.F., Northcutt, R.G., 1991. Comparative cytoarchitectonic analysis of some visual pretectal nuclei in teleosts. *Brain Behav. Evol.* 38, 92-114.
- De Marchis, S., Melcangi, R.C., Modena, C., Cavaretta, I., Peretto, P., Agresti, C., Fasolo, A., 1997. Identification of the glial cell types containing carnosine-related peptides in the rat brain. *Neurosci. Lett.* 237, 37-40.
- De Marchis, S., Modena, C., Peretto, P., Migheli, A., Margolis, F.L., Fasolo, A., 2000. Carnosine-related dipeptides in neurons and glia. *Biochemistry (Moscow)* 65, 969-980.
- Díaz Regueira, S., Anadón, R., 1989. Central projections of the lateral line nerves of *Chelon labrosus* (Teleosts, O. Perciformes). *J. Hirnforsch.* 30, 339-347.
- Díaz-Regueira, S., Anadón, R., 1995. Fine structure of the medullary lateral line area of *Chelon labrosus* (order Perciformes), a nonelectroreceptive teleost. *J. Comp. Neurol.* 351, 429-440.
- Díaz-Regueira, S., Anadón, R., 2000. Calretinin expression in specific neuronal systems in the brain of an advanced teleost, the grey mullet (*Chelon labrosus*). *J. Comp. Neurol.* 426, 81-105.
- Díaz-Regueira, S., Becerra, M., Anadón, R., 1992. Light- and electron microscopic study of oligodendrocytes in the lateral line area of the medulla in *Chelon labrosus*. *J. Hirnforsch.* 33, 477-485.
- Díaz-Regueira, S., Alvarez-Otero, R., Anadón, R., 1993. An immunocytochemical and ultrastructural study of a specialized glial layer of the medulla oblongata in a teleost, *Chelon labrosus*. *Tissue Cell* 25, 657-668.
- Ebbesson, S.O., Ito, H., 1980. Bilateral retinal projections in the black piranha (*Serrasalmus niger*). *Cell Tissue Res.* 213, 483-495.
- Forlano, P.M., Deitcher, D.L., Myers, D.A., Bass, A.H., 2001. Anatomical distribution and cellular basis for high levels of aromatase activity in the brain of teleost fish: aromatase enzyme and mRNA expression identify glia as source. *J. Neurosci.* 21, 8943-8955.
- Fritzsch, G., 1878. Untersuchungen über den feineren Bau des Fischgehirns. Mit besonderer Berücksichtigung der Homologies bei anderen Wirbeltierklassen. Gutmann, Berlin.

- García-Ovejero, D., Azcoitia, I., DonCarlos, L.L., Melcangi, R.C., García-Segura, L.M., 2005. Glia-neuron crosstalk in the neuroprotective mechanisms of sex steroid hormones. *Brain Res. Rev.* 48, 273-286.
- Gómez Segade, P., Anadón, R., 1986. Ciliated neurons of the nucleus praeopticus magnocellularis and nucleus lateralis tuberculi of an advanced teleost, *Chelon labrosus* (Risso, 1826). *J. Hirnforsch.* 27, 423-430.
- Gómez Segade, P., Anadón, R., 1988. Specialization in the diencephalon of advanced teleosts. *J. Morphol.* 197, 71-104.
- Gómez Segade, P., Anadón, R., Gómez Segade, L., 1989. Monoaminergic systems in the hypothalamus of the Acanthopterygian *Chelon labrosus*, with special reference to the organon vasculosum hypothalami. *Acta Zool. (Stockholm)* 70, 1-11.
- Grandel, H., Kaslin, J., Ganz, J., Wenzel, I., Brand, M., 2006. Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: origin, proliferation dynamics, migration and cell fate. *Dev. Biol.* 295, 263-277.
- Grover, B.G., Sharma, S.C., 1981. Organization of extrinsic tectal connections in goldfish (*Carassius auratus*). *J. Comp. Neurol.* 196, 471-488.
- Guthrie, D.M., 1990. The physiology of the optic tectum. In: Douglas, R.H., Djamgoz, M.B.A. (Eds.), *The Visual System of Fish*. Chapman and Hall, London, pp. 279-343.
- Hope, B.T., Michael, G.J., Knigge, K.M., Vincent, S.R., 1991. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 2811-2814.
- Ito, H., Kishida, R., 1978. Afferent and efferent fiber connections of the carp torus longitudinalis. *J. Comp. Neurol.* 181, 465-476.
- Ito, H., Murakami, T., Fukuoto, T., Kishida, R., 1986. Thalamic fiber connections in a teleost (*Sebastiscus marmoratus*): visual, somatosensory, octavolateral and cerebellar relay region to the telencephalon. *J. Comp. Neurol.* 250, 215-227.
- Ito, H., Yamamoto, N., Yoshimoto, M., Sawai, N., Yang, C.Y., Xue, H.G., Imura, K., 2003. Fiber connections of the torus longitudinalis in a teleost: *Cyprinus carpio* re-examined. *J. Comp. Neurol.* 457, 202-211.
- Jackson, M.C., Lenney, J.F., 1996. The distribution of carnosine and related dipeptides in rat and human tissues. *Inflamm. Res.* 45, 132-135.
- Kim, C.H., Ueshima, E., Muraoka, O., Tanaka, H., Yeo, S.Y., Huh, T.L., Miki, N., 1996. Zebrafish elav/HuC homologue as a very early neuronal marker. *Neurosci. Lett.* 216, 109-112.
- Kishida, K., 1979. Comparative study on the teleostean optic tectum. Lamination and cytoarchitecture. *J. Hirnforsch.* 20, 57-67.
- Leigh, P.N., Connick, J.H., Stone, T.W., 1990. Distribution of NADPH-diaphorase positive cells in the rat brain. *Comp. Biochem. Physiol.* C 97, 259-264.
- López, J.M., González, A., 2002. Ontogeny of NADPH diaphorase/nitric oxide synthase reactivity in the brain of *Xenopus laevis*. *J. Comp. Neurol.* 445, 59-77.
- Manso, M.J., Becerra, M., Becerra, M., Anadón, R., 1997. Expression of a low-molecular-weight (10 kDa) calcium binding protein in glial cells of the brain of the trout (Teleostei). *Anat. Embryol.* 196, 403-416.
- Margolis, F.L., 1974. Carnosine in the primary olfactory pathway. *Science* 184, 909-911.
- Margolis, F.L., 1978. Carnosine. *Trends Neurosci.* 1, 21-44.
- Margolis, F.L., 1980. Carnosine: an olfactory neuropeptide. In: Baker, J.L., Smith, T. (Eds.), *The Role of Peptides in Neuronal Function*. Dekker, New York, pp. 545-572.
- Margolis, F.L., Grillo, M., 1984. Carnosine, homocarnosine and anserine in vertebrate retinas. *Neurochem. Int.* 6, 207-209.
- Marusich, M.F., Furneaux, H.M., Henion, P.D., Weston, J.A., 1994. Hu neuronal proteins are expressed in proliferating neurogenic cells. *J. Neurobiol.* 25, 143-155.
- Meek, J., 1981. A Golgi-electronmicroscopic study of goldfish optic tectum. I. Description of afferents, cell types and synapses. *J. Comp. Neurol.* 199, 149-173.
- Meek, J., 1992. Why run parallel fibers parallel? Teleostean Purkinje cells as possible coincidence detectors in a timing device subserving spatial of temporal differences. *Neuroscience* 48, 249-283.
- Meek, J., Nieuwenhuys, R., 1998. Holosteans and teleosts. In: Nieuwenhuys, R., ten Donkelaar, H.J., Nicholson, C. (Eds.), *The Central Nervous System of Vertebrates*, vol. 2. Springer, Berlin, pp. 759-937.
- Meek, J., Schellart, N.A.M., 1978. A Golgi study of goldfish optic tectum. *J. Comp. Neurol.* 182, 89-122.
- Menuet, A., Anglade, I., Le Guevel, R., Pellegrini, E., Pakdel, F., Kah, O., 2003. Distribution of aromatase mRNA and protein in the brain and pituitary of female rainbow trout: comparison with estrogen receptor alpha. *J. Comp. Neurol.* 462, 180-193.
- Mueller, T., Wullmann, M.F., 2002. BrdU-, neuroD (nrd)- and Hu-studies reveal unusual non-ventricular neurogenesis in the postembryonic zebrafish forebrain. *Mech. Dev.* 117, 123-135.
- Murakami, T., Morita, Y., Ito, H., 1986. Cytoarchitecture and fiber connections of the superficial pretectum in a teleost, *Navodon modestus*. *Brain Res.* 373, 213-221.
- Niida, A., Ohno, T., Iwata, K.S., 1989. Efferent tectal cells of crucian carp: physiology and morphology. *Brain Res. Bull.* 22, 389-398.
- Northmore, D.P.M., 1984. Visual and saccadic activity in the goldfish torus longitudinalis. *J. Comp. Physiol.* A 155, 333-340.
- Northmore, D.P.M., Williams, B., Vanegas, H., 1983. The teleostean torus longitudinalis: responses related to eye movements; visuotopic mapping, and functional relations with the optic tectum. *J. Comp. Physiol.* A 150, 39-50.
- Okano, H.J., Darnell, R.B., 1997. A hierarchy of Hu RNA binding proteins in developing and adult neurons. *J. Neurosci.* 17, 3024-3037.
- Ota, D., Downing, J.E., Cook, J.E., 1999. Neuronal and glial cell types revealed by NADPH-diaphorase histochemistry in the retina of a teleost fish, the grass goby (*Zosterisessor ophiocephalus*, Perciformes, Gobiidae). *Anat. Embryol.* 200, 487-494.
- Park, H.C., Hong, S.K., Kim, H.S., Kim, S.H., Yoon, E.J., Kim, C.H., Miki, N., Huh, T.L., 2000. Structural comparison of zebrafish Elav/Hu and their differential expressions during neurogenesis. *Neurosci. Lett.* 279, 81-84.
- Peretto, P., Bonfanti, L., Merighi, A., Fasolo, A., 1998. Carnosine-like immunoreactivity in astrocytes of the glial tubes and in newly-generated cells within the tangential part of the rostral migratory stream of rodents. *Neuroscience* 85, 527-542.
- Pérez, S.E., Adrio, F., Rodríguez, M.A., Rodríguez-Moldes, I., Anadón, R., 1996. NADPH-diaphorase histochemistry reveals oligodendrocytes in the rainbow trout (teleosts). *Neurosci. Lett.* 205, 83-86.
- Preston, J.E., Hipkiss, A.R., Himsworth, D.T., Romero, I.A., Abbott, J.N., 1998. Toxic effects of beta-amyloid (25-35) on immortalized rat brain endothelial cell: protection by carnosine, homocarnosine and beta-alanine. *Neurosci. Lett.* 242, 105-108.
- Sakamoto, N., Ito, H., 1982. Fiber connections of the corpus glomerulosum in a teleost, *Navodon modestus*. *J. Comp. Neurol.* 205, 291-298.
- Saldaña, C.J., Tuerk, M.J., Kim, Y.H., Fernández, A.O., Arnold, A.P., Schlenger, B.A., 2000. Distribution and regulation of telencephalic aromatase expression in the zebra finch revealed with a specific antibody. *J. Comp. Neurol.* 423, 619-630.
- Satoh, G., Wang, Y., Zhang, P., Satoh, N., 2001. Early development of amphioxus nervous system with special reference to

- segmental cell organization and putative sensory cell precursors: a study based on the expression of pan-neuronal marker gene Hu/elav. *J. Exp. Zool.* 291, 354-364.
- Scherer-Singler, U., Vincent, S.R., Kimura, H., McGeer, E.G., 1983. Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. *J. Neurosci. Methods* 9, 229-234.
- Sueiro, C., Carrera, I., Molist, P., Rodríguez-Moldes, I., Anadón, R., 2004. Distribution and development of glutamic acid decarboxylase immunoreactivity in the spinal cord of the dogfish *Scyliorhinus canicula* (elasmobranchs). *J. Comp. Neurol.* 478, 189-206.
- Veney, S.L., Rissman, E.F., 2000. Immunolocalization of androgen receptors and aromatase enzyme in the adult musk shrew brain. *Neuroendocrinology* 72, 29-36.
- Wakamatsu, Y., Weston, J.A., 1997. Sequential expression and role of Hu RNA-binding proteins during neurogenesis. *Development* 124, 3449-3460.
- Wullimann, M.F., 1994. The teleostean torus longitudinalis: a short review on its structure, histochemistry, connectivity, possible function and phylogeny. *Eur. J. Morphol.* 32, 235-242.
- Wullimann, M.F., Northcutt, R.G., 1988. Connections of the corpus cerebelli in the green sunfish and the common goldfish: a comparison of cypriniform teleosts. *Brain Behav. Evol.* 32, 293-316.
- Wullimann, M.F., Roth, G., 1994. Descending telencephalic information reaches longitudinal torus and cerebellum via the dorsal preglomerular nucleus in the teleosts fish, *Pantodon buchholzi*: a case of neural preadaptation. *Brain Behav. Evol.* 44, 338-352.
- Xue, H.G., Yamamoto, N., Yang, C.Y., Kerem, G., Yoshimoto, M., Imura, K., Ito, H., 2003. Fiber connections of the torus longitudinalis and optic tectum in holocentrid teleosts. *J. Comp. Neurol.* 462, 194-212.

Anexo II



Anexo II





Short communication

Calretinin immunoreactivity in taste buds and afferent fibers of the grey mullet *Chelon labrosus*Sofía M. Díaz-Regueira^a, Iván Lamas^a, Ramón Anadón^{b,*}^aDepartment of Cell and Molecular Biology, Faculty of Sciences, University of A Coruña, 15071-A Coruña, Spain^bDepartment of Fundamental Biology, University of Santiago de Compostela, 15706-Santiago de Compostela, Spain

Accepted 30 October 2004

Available online 8 December 2004

Abstract

The presence of the calcium-binding protein calretinin in taste buds of a teleost, the thick-lipped grey mullet, was investigated using immunohistochemical techniques. Taste bud sensory cells had calretinin immunoreactivity. The nerve fiber plexus innervating taste buds, the ganglia and the viscerosensory roots projecting to the vagal lobe, also showed calretinin immunoreactivity. These results demonstrate for the first time the occurrence of calretinin in the taste buds and the taste afferent system of a teleost.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Theme: Sensory systems

Topic: Gustatory senses

Keywords: Taste buds; Calcium binding proteins; Calretinin; Calbindin; Immunohistochemistry; Teleosts

Taste receptor cells are specialized epithelial cells that possess receptors for sapid stimuli in their apical membrane, and respond to taste stimuli with modulation of neurotransmitter release in synapses with afferent fibers and/or other cells in the taste buds. The morphology of taste organs of teleost fishes has been studied extensively [16,27,28]. In teleosts, taste buds are generally distributed in the epithelium that lines the oropharyngeal cavity and, in some species, they extend to the external surface of the body, either by themselves or in association with food contact and localization areas such as the lips, barbels or fins. In mullets, as in other teleosts, the apical surface of taste cells exhibits a tuft of thick and thin microvilli protruding between the borders of adjacent, ridged epithelial cells [11].

The family of EF-hand calcium binding proteins (CaBP) consists of proteins with high affinity for calcium ions that include the closely related calbindin D-28 kDa (calbindin)

and calretinin (29 kDa; also called calbindin-2). These two CaBPs have been found in some neurons of the central and peripheral nervous systems of vertebrates [2,26]. They are expressed in specific neuron types and may participate in the regulation of important processes such as calcium transients, neurotransmitter release and synaptic modifications by controlling the intracellular calcium concentrations [2,3,8,26]. Recent studies with knockout mice in the cerebellum indicate that these calcium-binding proteins have evolved as functionally distinct, physiologically relevant modulators of intracellular calcium transients [30]. Analysis of different brain regions suggests that these proteins are involved in regulating calcium pools critical for synaptic plasticity [30]. Calbindin or calretinin are often found in neurons associated with sensory pathways, such as auditory and taste pathways [2,19]. As far as we are aware, there have been no reports on the presence of CaBPs in taste buds of fishes.

Our aim was to examine the distribution and expression of calretinin in the taste system of the grey mullet (*Chelon labrosus*, O. Perciformes). This advanced teleost species

* Corresponding author. Fax: +34 981 596904.

E-mail address: bfanadon@usc.es (R. Anadón).

is the only fish in which the distribution of calretinin in the brain has been reported comprehensively [6]. Moreover, the results of this study have suggested the existence of calretinin in primary fibers of the viscerosensory system.

Larvae (5–20 mm in length) and juveniles (30–50 mm in length) grey mullets were caught in the Ría of A Coruña (northwest Spain) and anesthetized with 0.01% tricaine methane sulfonate (Sigma, St. Louis, MO) in seawater prior to fixation. All procedures conformed to the guidelines of the European Community for animal care and experimentation. The specimens were fixed with Bouin's fluid and embedded in paraffin, or fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB), cryoprotected with 30% sucrose in PB, embedded in Tissue Tec, and frozen with liquid nitrogen-cooled isopentane. Series of transverse and sagittal paraffin sections (10 μ m thick) were cut on a rotary microtome, mounted in gelatinized slides, dewaxed and rehydrated before immunohistochemistry. Frozen blocks were cut on a cryostat (10–20 μ m thick) and mounted on gelatinized slides. Sections were treated with 3% H₂O₂ in phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7.4 to inactivate endogenous peroxidase. They were incubated with 5% normal goat serum (Dakopatts, Barcelona, Spain) and 0.2% Triton X-100 (Sigma) in PBS for 1 h to reduce non-specific background, and then incubated overnight at 4 $^{\circ}$ C with a polyclonal antibody raised in rabbit against recombinant human calretinin (Number: 7699/4; 1:1000; Swant, Bellinzona, Switzerland) diluted in PBS or with a monoclonal antibody against α -tubulin (Sigma, dilution 1:1000) for fibers staining. After rinsing in PBS, the sections were incubated for 60 min at room temperature with goat anti-rabbit serum (1:30; Dakopatts) or biotinylated anti-rabbit IgG (1:500; Dakopatts) or with goat anti mouse serum (1:50; Dakopatts), washed in PBS and incubated for 30 min with peroxidase anti-peroxidase (PAP) complex (1:500; Dakopatts) or streptavidin-biotin (ABC) complex (Dakopatts). The sections were then rinsed in PBS and the peroxidase reaction was allowed to run for 10 min in 0.05 M Tris/HCl-buffer containing 0.05% diaminobenzidine (DAB, Sigma) and 0.03% H₂O₂. The sections were then washed in Tris/HCl-buffer, dehydrated in ethanol, and mounted with Eukitt (O. Kindler, Freiburg, Germany). According the manufacturer specifications, the calretinin antibody does not cross-react with calbindin D-28 kDa or other known calcium-binding proteins, as determined by its distribution in the brain, as well as by immunoblotting. The specificity of the calretinin antibody in mullet brain protein extracts has been previously tested by Western blot: it recognizes a single protein band of similar MW (29 k) than the band recognized in rat brain extracts [6]. As a further control, sections in which the first antibody was either omitted or replaced by pre-immune rabbit serum showed no staining of structures.

In order to investigate possible expression of calbindin D-28 kDa in taste buds of mullet, sections of mullet heads prepared as above were processed for immunohistochemistry using monoclonal (Number: 300; Swant, dilution

1:2000) or rabbit polyclonal (Number: CB 38a; Swant, dilution 1:3000) antibodies, which have been raised against calbindin purified from chick gut and recombinant rat calbindin, respectively. The monoclonal antibody was revealed as indicated above for α -tubulin, and the polyclonal calbindin antibody as per calretinin. Since no staining of either nerve cells or taste buds was observed using these antibodies in mullet, tests of specificity were not performed.

The sections were viewed and images digitized under a photomicroscope (Nikon) with a color digital camera and imaging software. The photographs were converted to gray scale and adjusted for brightness and contrast.

In larval and juvenile gray mullets, all taste buds exhibited strong calretinin immunoreactivity. Numerous taste buds were localized in the lips, the oropharyngeal cavity including the skin covering the gill bars, and also in the esophagus. The immunohistochemical analysis demonstrated that taste bud sensory cells display calretinin immunoreactivity, this immunoreactivity being localized through the cytoplasm. In the lips, taste buds were scarce, but they were very abundant in the mouth roof, tongue and gill bars (Fig. 1A–E), and also in the esophagus epithelium among the mucous tubular glands (Fig. 1F–G). In larvae and juveniles the appearance of taste buds was identical independently of its localization. In vertical sections of the taste buds, the sensory cells were bottle-shaped with a long neck that reach the epithelium surface where the pore of taste bud was located (Fig. 1A, B). Nuclei were usually located basally (Fig. 1B–D). Coronal sections of taste buds show a crown-like distribution of calretinin-ir cells close to each other (Fig. 1C). No positive structures were observed in the taste buds with any of the two anti-calbindin antibodies.

In addition, the nerve fiber plexus below taste buds showed calretinin-ir fibers, a few extending to the base of taste buds where they were masked by the intense calretinin-ir stained sensory cells (Fig. 1A, B, F). Afferent fibers leading to the taste bud were also demonstrated using the anti- α -tubulin antibody. Observations with this method corroborate that these fibers end at the base of the bud, and do not originate from taste cells (Fig. 1H). The bundles of afferent fibers can be followed from taste buds to the viscerosensory ganglia, where most ganglion cells were calretinin-ir, and to the viscerosensory roots (Fig. 1I–J). Calretinin-ir fibers enter in the viscerosensory (vagal) lobe giving rise to a dense calretinin-ir neuropil in the medial region (Fig. 1K). In the viscerosensory lobe there were also small calretinin-ir perikarya (Fig. 1K).

The present study demonstrates for the first time the presence of calretinin-ir cells in the taste buds of a fish. The taste buds of mullet [11], like those of other teleosts [10], consist of long spindle-shaped cells of two types, light and dark, on the basis of cytoplasmic electron density. Two other cell types are often associated with taste buds in other species, the marginal cells and the basal cells. In mullet larvae and juveniles, all taste buds contain numerous

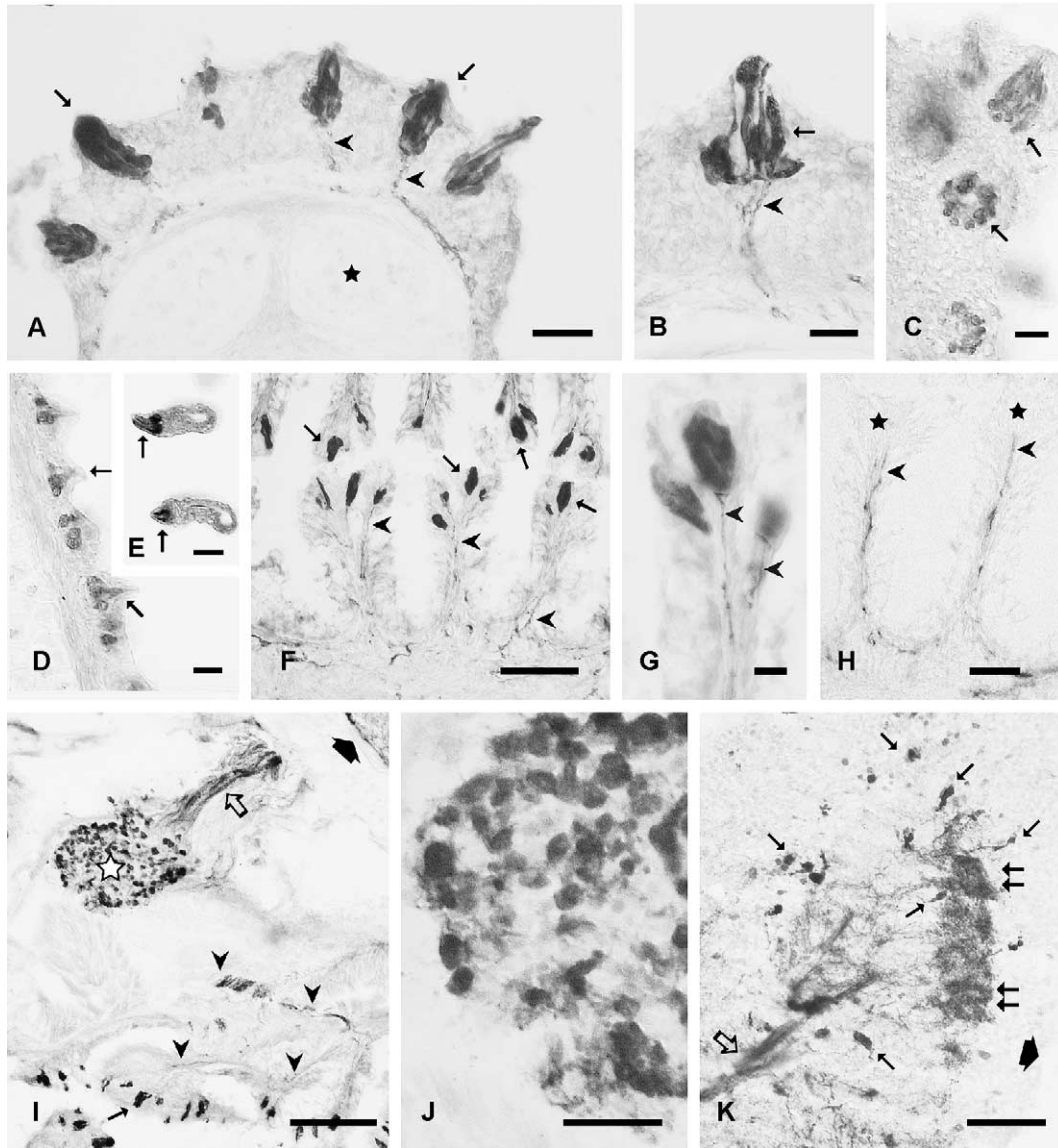


Fig. 1. Sections of the oropharyngeal region (A–E), esophagus (F–H), vagal ganglion (I, J) and vagal lobe (K) of larval (D, E) and juvenile mullet (A–C, F–K). (A) Section of the tongue showing numerous CR-ir sensory cells in taste buds (arrows). Arrowheads, afferent taste fibers in the base of the buds. Star, tongue cartilage. (B) Detail of the CR-ir sensory cells (arrow) and afferent fibers (arrowhead) in a tongue bud. (C) Section of the palate showing taste buds cut in different orientations (arrows). Note the crown-like distribution of CR-ir cells in the bud. (D) Section along a gill bar showing numerous CR-ir cells in taste buds. (E) Transverse section of small gill filaments showing taste buds (arrows). (F) Section showing the pleated wall of the esophagus bearing a number of CR-ir taste buds (arrows), mainly in the apices of the folia. The arrowheads point to CR-ir afferent fibers ending in the buds. (G) Detail of esophagus taste buds and their CR-ir afferent fibers (arrowheads). (H) Detail of two folia of the esophagus wall showing α -tubulin-immunoreactive afferent fibers (arrowheads) ending at the base of tubulin-negative taste buds (stars). (I) Transverse section through the pharyngeal region of the head at the level on the vagal ganglion (star) showing CR-ir ganglion cells. Note peripheral bundles of CR-ir vagal fibers coursing toward taste buds (arrowheads), and a central vagal branch (outlined arrow) also showing CR-ir fibers. The wide solid arrow points to the surface of the medulla oblongata. (J) Detail of the vagal ganglion showing numerous CR-ir ganglion cells. (K) Transverse section through the vagal lobe showing CR-ir fibers in a vagus nerve sensory root (outlined arrow), and the dense field of terminals of CR-ir primary sensory fibers (double arrows). Note the presence of small CR-ir perikarya (thin arrows). The wide solid arrow points to the fourth ventricle. Scale bars: 25 μ m (A, H, J), 10 μ m (B, C, G), 15 μ m (D, E), 50 μ m (F, K), 100 μ m (I).

elongated bottle-shaped calretinin-ir cells. Judging from their number, shape and location, our light microscope observations indicate that these cells are not basal or marginal cells, but sensory cells, probably representing the majority of these cells. However, whether they correspond to the light and/or the dark cells reported with electron microscopy was not determined. On the other hand, the

distribution of taste buds in the oropharyngeal region of the grey mullet is similar to that reported anatomically in other teleosts, but it is noticeable the abundance of these structures observed in the esophagus. This appears a characteristic of omnivorous fishes [9] such as the mullet.

In the axolotl, calretinin antibodies selectively label a subset of primarily fusiform cells within each taste bud,

although not the afferent fibers [4]. However, taste bud cells do not express calretinin either in the rat [15] or in the cat [31]. The existence of other calcium-binding proteins has been reported in taste buds of rodents [13,17,23,24,33] and amphibians [18,34]. In rats, the taste buds of circumvallate and foliate papillae contain two to three calbindin-ir sensory cells each, but no calbindin-ir cells were observed in other papillae [23,24]. Amphibians are apparently heterogeneous as regards the calcium-binding proteins expressed in taste buds. In frogs, putative taste receptor cells were calbindin-ir, but the afferent fibers were calbindin-negative [34]. In taste buds of *Xenopus laevis*, calbindin-ir material was observed in supporting cells but not in sensory cells [18]. Of the vertebrates investigated to date, the presence of calretinin in taste bud receptor cells thus appears to be confined to the grey mullet and the axolotl.

Calbindin and calretinin are two closely related proteins that exhibit a high degree of homology in terrestrial vertebrates [29], sharing about 60% of their amino acid sequence in mouse. Calretinin immunoreactivity has been observed in some neurons of all vertebrates investigated, and also in motoneurons of a primitive chordate, the amphioxus [5]. Western blot analysis has confirmed that the polyclonal calretinin antibody used in this study labels a single band of protein in brain extracts of rat, mullet [6] and a primitive ray-finned fish [12], indicating that the substance found in taste buds is calretinin. However, immunohistochemistry using antibodies to calbindin do not stain any structure in taste buds [present results] or the brain [6] of mullet. This probably indicates that calbindin is not expressed in neural structures of mullet, as suggested in other teleosts [7,20]. As regards the significance of this, the same calbindin antisera used here stain some neurons in the retina, and recognize a 28k protein in brain extracts, of a primitive ray-finned fish [12]. Moreover, some types of neuron are immunostained by calbindin antibodies in lamprey [21]. Since both calbindin and calretinin are expressed in neurons of a lamprey and a primitive ray-finned fish, the most probable evolutionary scenario for calbindin is that it appeared early in vertebrates by duplication of the ancestral calbindin/calretinin gene, but its expression has been lost secondarily in some teleost lines. This might explain the marked differences of expression of calretinin/calbindin in taste buds observed between mullet and other vertebrates.

Taste receptor cells respond to taste stimuli with modulation of release of neurotransmitter onto a synapse with afferent fibers. Because neurotransmitter release is typically dependent on an increase in intracellular Ca^{2+} concentrations, it is expected that the responses of taste cells to stimuli involve at least local increases in Ca^{2+} concentration. Several studies indicated that the intracellular free calcium concentration increases markedly following application of bitter substances to single taste receptor cells of the rat [1] and guinea pig [25]. In channel catfish, the taste system responds to taste stimuli with heterogeneous

responses involving both increases and decreases in Ca^{2+} concentrations [35]. It has been suggested that the CaBPs could play a buffer role, limiting the amplitude of changes in intracellular free calcium concentration, and thus protecting against excitotoxicity caused by an increased liberation of neurotransmitters [19,22]. Studies in cerebellum of mice lacking calretinin reveal altered firing patterns of granule cells (calretinin-deficient granule cells exhibit faster action potentials and generate repetitive spike discharge) and Purkinje cells [8], results suggesting that calcium-binding proteins modulate intrinsic neuronal excitability and may therefore play a role in information processing. The precise role(s) of calretinin and calbindin in taste bud cells remains to be elucidated.

In addition to its expression in taste receptor cells, calretinin is also found in different peripheral and central viscerosensory structures of mullet, such as primary afferent ganglion cells and fibers (present results), some vagal lobe cells, and a large proportion of neurons of the secondary gustatory nucleus, which is located in the isthmus [6]. In the rat, the presence of calretinin in some viscerosensory afferent nerve fibers has also been reported [14,15]. The viscerosensory ganglia also exhibit a number of calretinin-ir ganglion cells [13], and co-expression of calretinin and calbindin has been observed in a number of these cells [32]. On the other hand, different parabrachial nuclei of the rat contain calretinin-ir neurons [3]; some of these nuclei are considered homologous to the teleost secondary gustatory nucleus. Taken together, these results suggest that calretinin is involved in modulation of the activity at various levels of the visceral/gustatory pathways in both teleosts and mammals.

Acknowledgments

This work was supported by the Spanish Science and Technology Ministry (BXX2000-0453) and the Xunta de Galicia (PGIDT01PXI20007PR).

References

- [1] M.H. Akabas, J. Dodd, Q. Al-Awqati, A bitter substance induces a rise in intracellular calcium in a subpopulation of rat taste cells, *Science* 242 (1988) 1047–1050.
- [2] C.I. Andressen, I. Blqmcke, M.R. Celio, Calcium binding proteins: selective markers of nerve cells, *Cell Tissue Res.* 271 (1993) 181–208.
- [3] R. Arai, L. Winsky, M. Arai, D.M. Jacobowitz, Immunohistochemical localization of calretinin in the rat hindbrain, *J. Comp. Neurol.* 310 (1991) 21–44.
- [4] L.A. Barlow, C.B. Chien, R.G. Northcutt, Embryonic taste buds develop in the absence of innervation, *Development* 122 (1996) 1103–1111.
- [5] A. Castro, M. Becerra, M.J. Manso, R. Anadón, Somatomotor system of the adult amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*) revealed by an anticalretinin antiserum: an immunocytochemical study, *J. Comp. Neurol.* 477 (2004) 161–171.

- [6] S.M. Díaz-Regueira, R. Anadón, Calretinin expression in specific neuronal systems in the brain of an advanced teleost, the grey mullet (*Chelon labrosus*), *J. Comp. Neurol.* 426 (2000) 81–105.
- [7] M.A. Friedman, M. Kawasaki, Calretinin-like immunoreactivity in mormyrid and gymnarichid electrosensory and electromotor systems, *J. Comp. Neurol.* 387 (1997) 341–357.
- [8] D. Gall, C. Roussel, I. Susa, E. D'Angelo, P. Rossi, B. Bearzatto, M.C. Galas, D. Blum, S. Schurmans, S.N. Schiffmann, Altered neuronal excitability in cerebellar granule cells of mice lacking calretinin, *J. Neurosci.* 23 (2003) 9320–9327.
- [9] R. Gentile, F. Abbate, A. Di Summa, G.P. Germana, G. Vita, G. Germana, G.F. Passantino, Comparative anatomico-microscopic observations on the esophagus of teleosts with different feeding habits, *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 69 (1993) 137–144.
- [10] A. Hansen, K. Reutter, E. Zeiske, Taste bud development in the zebrafish, *Danio rerio*, *Dev. Dyn.* 223 (2002) 483–496.
- [11] F.E. Hossler, L.H. Merchant, Morphology of taste buds on the gill arches of the mullet *Mugil cephalus*, and the killifish *Fundulus heteroclitus*, *Am. J. Anat.* 166 (1983) 299–312.
- [12] G. Huesa, J. Yáñez, R. Anadón, Calbindin and calretinin immunoreactivities in the retina of a chondrosteian, *Acipenser baeri*, *Cell Tissue Res.* 309 (2002) 355–360.
- [13] H. Ichikawa, C.J. Helke, Coexistence of calcium-binding proteins in vagal and glossopharyngeal sensory neurons of the rat, *Brain Res.* 768 (1997) 349–353.
- [14] H. Ichikawa, D.M. Jacobowitz, L. Winsky, C.J. Helke, Calretinin-immunoreactivity in vagal and glossopharyngeal sensory neurons of the rat: distribution and coexistence with putative transmitter agents, *Brain Res.* 557 (1991) 316–321.
- [15] H. Ichikawa, D.M. Jacobowitz, T. Sugimoto, Calretinin-immunoreactivity in the oro-facial and pharyngeal regions of the rat, *Neurosci. Lett.* 146 (1992) 155–158.
- [16] M. Jakubowski, M. Whitear, Comparative morphology and cytology of taste buds in teleosts, *Z. Mikrosk.-Anat. Forsch.* 104 (1990) 529–560.
- [17] E.W. Johnson, P.M. Eller, B.W. Jafek, A.W. Norman, Calbindin-like immunoreactivity in two peripheral chemosensory tissues of the rat: taste buds and vomeronasal organ, *Brain Res.* 575 (1992) 319–324.
- [18] H.H. Kerschbaum, A. Hermann, Calcium-binding proteins in chemoreceptors of *Xenopus laevis*, *Tissue Cell* 24 (1992) 719–724.
- [19] C. Lohmann, E. Friauf, Distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin and calretinin in the auditory brainstem of adult and developing rats, *J. Comp. Neurol.* 367 (1996) 90–109.
- [20] M.J. Manso, M. Becerra, M. Becerra, R. Anadón, Expression of a low-molecular-weight (10 kDa) calcium binding protein in glial cells of the brain of the trout (Teleostei), *Anat. Embryol.* 196 (1997) 403–416.
- [21] M. Megías, R. Alvarez-Otero, M.A. Pombal, Calbindin and calretinin immunoreactivities identify different types of neurons in the adult lamprey spinal cord, *J. Comp. Neurol.* 455 (2003) 72–85.
- [22] R.J. Miller, Regulation of calcium homeostasis in neurons: the role of calcium binding proteins, *Biochem. Soc. Trans.* 23 (1995) 629–632.
- [23] Y. Miyawaki, I. Morisaki, M.J. Tabata, K. Kurisu, S. Wakisaka, Calbindin D28k-like immunoreactivity in the gustatory epithelium in the rat, *Neurosci. Lett.* 214 (1996) 29–32.
- [24] Y. Miyawaki, I. Morisaki, M.J. Tabata, T. Maeda, K. Kurisu, S. Wakisaka, Calbindin D28k-like immunoreactivity in the developing and regenerating circumvallate papilla of the rat, *Cell Tissue Res.* 291 (1998) 81–90.
- [25] C.N. Orola, T. Yamashita, N. Harada, H. Amano, M.T. Kumazawa, Intracellular free calcium concentration in single taste receptor cells in the guinea pig, *Acta Oto-laryngol.* 112 (1992) 120–127.
- [26] M. Parmentier, M. Glysens, F. Rypens, D.E.M. Lawson, J.L. Pasteels, R. Pochet, Calbindin in vertebrate classes: immunohistochemical localization and Western blot analysis, *Gen. Comp. Endocrinol.* 65 (1987) 399–407.
- [27] K. Reutter, Chemoreceptors, in: M. Bereither-Hahn (Ed.), *Biology of the Integument*, Springer Verlag, Stuttgart, 1986, pp. 586–604.
- [28] K. Reutter, M. Witt, Morphology of vertebrate taste organs and their nerve supply, in: S.A. Simon, S.D. Roper (Eds.), *Mechanisms of Taste Transduction*, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 29–82.
- [29] J. Rogers, Calretinin: a gene for a novel calcium binding protein expressed principally in neurons, *J. Cell Biol.* 105 (1987) 1343–1353.
- [30] B. Schwaller, M. Meyer, S. Schiffmann, dNewT functions for doldT proteins: the role of the calcium-binding proteins calbindin D-28k, calretinin and parvalbumin, in cerebellar physiology. Studies with knockout mice, *Cerebellum* 1 (2002) 241–258.
- [31] T. Shin, I. Nahm, T. Maeyama, J. Miyazaki, H. Matsuo, Y. Yu, Morphologic study of the laryngeal taste buds in the cat, *Laryngoscope* 105 (1995) 1315–1321.
- [32] M. Wank, W.L. Neuhuber, Local differences in vagal afferent innervation of the rat esophagus are reflected by neurochemical differences at the level of the sensory ganglia and by different brainstem projections, *J. Comp. Neurol.* 435 (2001) 41–59.
- [33] M. Yamagishi, Y. Ishizuka, M. Fujiwara, H. Nakamura, S. Igarashi, Y. Nakano, R. Kuwano, Distribution of calcium binding proteins in sensory organs of the ear, nose and throat, *Acta Oto-laryngol.* 506 (1993) 85–89.
- [34] S. Yoshie, M. Kumakura, K. Toyoshima, Villin is a possible marker of receptor cells in frog taste organs, *Histochem. Cell Biol.* 119 (2003) 447–450.
- [35] M.M. Zviman, D. Restrepo, J.H. Teeter, Single taste stimuli elicit either increases or decreases in intracellular calcium in isolated catfish taste cells, *J. Membr. Biol.* 149 (1996) 81–88.

